

**Kristallstrukturen mit kleinen Sondenmolekülen:
Ausleuchten von Bindetaschen, Startpunkt für ein Fragment-
basiertes Wirkstoffdesign und Erhalten von
Phaseninformationen zur Strukturlösung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Pharmazie

der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

vorgelegt von

Jürgen Behnen

aus Meppen

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Zweitgutachter: Dr. A. Heine

Tag der mündlichen Prüfung am: 24.09.10

Die Untersuchungen zum vorliegenden Thema wurden auf Anregung von Prof. Dr. G. Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2007 bis September 2010 durchgeführt.

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt“

Albert Einstein

Meinen Eltern

Abkürzungen

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
AChE	Acetylcholinesterase
Ach	Acetylcholin
ACL	β -Alanyl-CoA-Ammoniak-Lyase
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
c	zyklisch
CDP	Cytidindiphosphat
CDPME	Cytidindiphosphatmethylethritol
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DTT	Dithiothreitol
DXI	D-Xyloseisomerase
E.C.	Enzyme Commission
EctD	Ectoin-Hydroxylase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Endothiapepsin
FPLC	Fast performance liquid chromatography
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure

His	Histidin
HT	His ₈ -Tag
HTS	Hochdurchsatzscreening
Ile	Isoleucin
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-4-phosphat-synthase
Kan	Kanamycin
k	Kilo
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
LogP	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
Lys	Lysin
M	Molar (Konzentrationsangabe; 1 mol/l)
mA	milli Ampere
MAD	Multi anomalous Dispersion
ME	Methylerythritol
MEP	2-Methyl-erythritol-4-phosphat
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MSCS	Multi solvent crystal structure
MW	Molekulargewicht
MWCO	oberste Molekulargewichtsgrenze
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
nm	Nanometer (1 nm = 10 ⁻⁹ m)
NiSO ₄	Nickelsulfat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol

Phe	Phenylalanin
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKA	cAMP abhängige Proteinkinase
PSE	Periodensystem der Elemente
rms	root mean square
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SAD	Single Anomalous Dispersion
Sap 2	Sekretorische Aspartatprotease 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschluß Chromatographie
Ser	Serin
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGT	tRNA-Guanin Transglykosylase
TLN	Thermolysin
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tyr	Tyrosin

1	Einleitung.....	17
1.1	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	17
1.1.1	Fragmentbasierte Leitstrukturentwicklung	18
1.1.2	Aufgabenstellung	20
2	3D-Strukturbestimmung von Proteinen; Lösen des Phasenproblems mit Hilfe von Single Anomalous Dispersion	23
2.1	Röntgenstrukturanalyse	23
2.2	Single Anomalous Dispersion (SAD).....	25
3	Zielstrukturen.....	29
3.1	Thermolysin	29
3.1.1	Einleitung.....	29
3.1.2	Tertiäre Struktur von Thermolysin	30
3.1.3	Katalytischer Mechanismus von Thermolysin	31
3.2	tRNA-Guanin Transglykosylase.....	33
3.2.1	Einleitung.....	33
3.2.2	Tertiäre Struktur der tRNA-Guanin Transglykosylase	34
3.2.3	Katalytischer Mechanismus der tRNA-Guanin Transglykosylase	35
3.3	cAMP abhängige Proteinkinase.....	37
3.3.1	Einleitung.....	37
3.3.2	Tertiärstruktur der C-Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase	38
3.3.3	Katalytischer Mechanismus der Proteinkinase A	39
3.4	4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Synthase	41
3.5	D-Xyloseisomerase	41
3.5.1	Einleitung.....	41
3.5.2	Tertiäre Struktur der <i>Streptomyces rubiginosus</i> D-Xyloseisomerase	42

3.5.3	Katalytischer Mechanismus der <i>Streptomyces rubiginosus</i> D-Xyloseisomerase	44
3.6	Acetylcholinesterase.....	47
3.6.1	Einleitung	47
3.6.2	Tertiäre Struktur der <i>Torpedo californica</i> Acetylcholinesterase.....	48
3.6.3	Katalytische Mechanismus der Acetylcholinesterase	49
3.7	Endothiapepsin	51
3.7.1	Einleitung	51
3.7.2	Tertiäre Struktur von Endothiapepsin	51
3.7.3	Katalytischer Mechanismus der Aspartatproteasen	52
3.8	Sekretorische Aspartatprotease 2	55
3.8.1	Einleitung	55
3.8.2	Tertiäre Struktur der Sekretorischen Aspartatprotease 2	56
4	Use of xenon/protein complexes as a generic tool for SAD phasing of in house data	57
4.1	Introduction	57
4.2	Methods.....	59
4.2.1	Crystallization	59
4.2.2	Xenon derivatization	60
4.2.3	Data collection and processing.....	61
4.2.4	Phase determination	62
4.2.5	Model building and refinement.....	63
4.3	Results and discussion.....	65
4.4	Conclusion.....	68
4.5	Weitere Ergebnisse.....	71
4.5.1	Kristallisation von TGT und Sap2	71

4.5.2	Xenon-Derivatisierung von TGT und Sap2.....	72
4.5.3	Datensammlung und Prozessierung.....	72
4.5.4	Phasierungsstatistiken.....	73
4.5.5	Ergebnisse und Diskussion.....	74
5	Experimental Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery.....	77
5.1	Introduction.....	77
5.2	Methods.....	79
5.2.1	Crystallization.....	79
5.2.2	Fragment Soaking.....	80
5.2.3	Data Collection and Processing.....	81
5.2.4	Structure determination and refinement.....	81
5.2.5	DrugScoreHotSpots.....	83
5.3	Results and Discussion.....	84
5.4	Conclusion.....	100
5.5	Weitere Ergebnisse.....	101
5.5.1	Weitere Proteinsysteme.....	101
5.5.2	Kristallisation von ACL, AChE, EctD, und TGT.....	102
5.5.3	Verwendete Sondenmoleküle.....	103
5.5.4	Datensammlung von TLN in Komplex mit 2-Bromessigsäure und N ₂ O.....	105
5.5.5	Ergebnisse und Diskussion.....	107
6	Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen gegen Malaria und Tuberkulose - Expression, Reinigung und Kristallisation der CDPME-Synthetase.....	111
6.1	Einleitung.....	111
6.2	Methoden.....	116
6.2.1	Liste der verwendeten Reagenzien und Puffer.....	116

6.2.2	Medien und Anzuchtbedingungen	117
6.2.3	Proteinexpression	118
6.2.4	Proteinreinigung	119
6.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	122
6.2.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	122
6.3	Thermofluoro-Assay	125
6.4	Protein-Kristallographie	128
6.5	Ergebnisse	129
6.5.1	Expression und Reinigung des Proteins IspD	129
6.5.2	Thermofluoro-Assay	132
6.5.3	Kristallisation von IspD	134
6.5.4	Liganden <i>Soaking</i>	136
6.6	Zusammenfassung und Ausblick	137
7	Zusammenfassung	139
8	Literatur	145

1 Einleitung

1.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

In der modernen Entwicklung neuer Wirkstoffe ist das Verfahren des so genannten strukturbasierten Wirkstoffdesigns kaum noch wegzudenken. Dieser Ansatz beruht auf der genauen Analyse bekannter dreidimensionaler Proteinstrukturen und deren Bindetaschen. Mittels experimenteller und computergestützter Ansätze ist man in der Lage, die aktiven Zentren der Zielenzyme im Detail zu charakterisieren und zu validieren. Dadurch können bestimmte Wechselwirkungsbereiche („Hot Spots“) (Goodford 1985; Verdonk, Cole et al. 1999) ausfindig gemacht werden. Diese Informationen können dann wiederum dazu benutzt werden, um proteinbasierte Pharmakophore zu entwickeln und um die durch z.B. Hochdurchsatzscreening (HTS) oder Fragmentscreening gefundenen, so genannten Hits, zu optimieren, bis letztendlich ein Ligand mit dem gewünschten Profil gefunden ist.

Durch einen stetigen methodischen Fortschritt in der Protein-Kristallographie und NMR-Spektroskopie ist es uns heute möglich, routinemäßig 3D-Strukturen sowohl von *de novo* Proteinstrukturen als auch von Protein/Ligand-Komplexen zu bestimmen. Wie in der Abbildung 1 zu erkennen, nimmt die Anzahl der in der öffentlich zugänglichen Protein-Datenbank (PDB) (Bernstein, Koetzle et al. 1977) hinterlegten dreidimensionalen Proteinstrukturen exponentiell zu. Diese hohe Zahl, wobei die tatsächliche Anzahl an bekannten Proteinstrukturen deutlich höher liegt, da die in der pharmazeutischen Industrie ermittelten 3D-Strukturen in der Regel nicht veröffentlicht werden, repräsentiert die Bedeutung des strukturbasierten Wirkstoffdesigns.

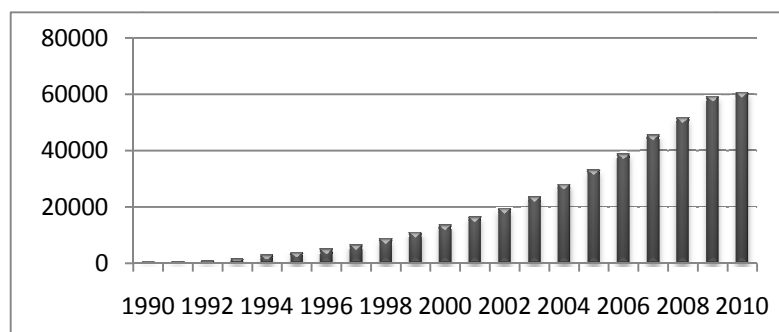


Abbildung 1: Anzahl der in der PDB hinterlegten Strukturen ab 1990 bis März 2010;
Quelle: <http://www.rcsb.org>

1.1.1 Fragmentbasierte Leitstrukturentwicklung

In den Neunzigern wurden das Hochdurchsatzscreening (HTS) und die kombinatorische Chemie entwickelt, um neue Methoden bereitzustellen, die es ermöglichen sollten, neue Leitstrukturen schneller und effizienter zu entdecken (Broach and Thorner 1996). Später wurde diese Methode durch das computerbasierte virtuelle Screening ergänzt (Walters, Stahl et al. 1998). Allerdings blieb die Erfolgsquote beider Verfahren hinter den Erwartungen zurück, denn die Eigenschaften der gefundenen Substanzen wiesen oftmals ungeeignete ADME-Eigenschaften (Adsorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion) auf (Oprea, Davis et al. 2001), bzw. ihrer Größe als typische Pharmamoleküle bei einer Bindungsaffinitäten mikromolaren Bereich ließ kaum Raum für eine effiziente Optimierung der Bindungseigenschaften zu. Dieser Tatsache bedingt, dass es kaum noch möglich ist, aufgefundene Treffer so weiter zu optimieren, ohne dabei die Anforderungen an ein Arzneimittel bezüglich Molekulargewicht, Donor-, Akzeptoreigenschaften oder Lipophilie zu überschreiten (Lipinski 2000). Um die Aktivität eines gefundenen Liganden bezüglich seiner Größe besser beurteilen zu können, wurde die so genannte *Ligand efficiency* als Gütekriterium eingeführt. Diese beschreibt die Aktivität eines Moleküls gegen ein biologisches Zielenzym in Abhängigkeit seiner Größe (Hopkins, Groom et al. 2004).

Da auf der technischen Ebene enorme Fortschritte gemacht wurden, lassen sich heutzutage zunehmend kleinere Moleküle durchmustern und deren Bindung an das Enzym sowohl durch biophysikalische als auch strukturelle Methoden detektieren. Als biophysikalische Methode ist hier besonders die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) zu nennen (McDonnell 2001). Aber auch die Röntgenstrukturanalyse und Kernresonanzspektroskopie (NMR) (Metz, Ottleben et al. 2003) sind heute in der Lage, kleine schwachbindende Moleküle im Protein zu erkennen. Ist es dann möglich, die Struktur eines solchen fragmentartigen Protein-/Ligandkomplexes zu bestimmen, ergeben sich viele Möglichkeiten diesen Hit bis hin zu einem potentiellen Arzneistoff zu optimieren.

Aufgrund dieser Tatsachen und dem mäßig erfolgreichen, aber kostspieligen HTS hat man sich an ein Konzept erinnert, das Anfang der Achtziger Jahre zum ersten Mal publiziert wurde. Jenks beschrieb die Hypothese, dass es effektiver sein müsste, sehr

kleine Moleküle, so genannte Fragmente, zu durchmustern um diese anschließend durch Verknüpfen miteinander oder durch Erweiterung zu vergrößern (Jencks 1981). Aber erst 1996 wurde diese Theorie von Shuker und Kollegen in die Praxis umgesetzt. Sie beschrieben, dass sie anhand von Struktur-Aktivitäts-Beziehung durch NMR in der Lage waren, kleine Moleküle aufgrund ihrer Bindung am bevorzugten Enzym zu selektieren (Shuker, Hajduk et al. 1996). Dadurch war die fragmentbasierte Leitstrukturentwicklung geboren. Im Jahr 2000 wurde die Verwendung der Röntgenstrukturanalyse zum Durchmustern und Bestimmen von Protein-/Fragmentkomplexen publiziert (Nienaber, Richardson et al. 2000). Konträr zum HTS nutzt man beim fragmentbasierten Ansatz Bibliotheken weniger tausend, schwachbindender, eher hydrophiler Moleküle mit einem Molekulargewicht im Bereich von 150 – 250 Da (siehe Abbildung 2.).

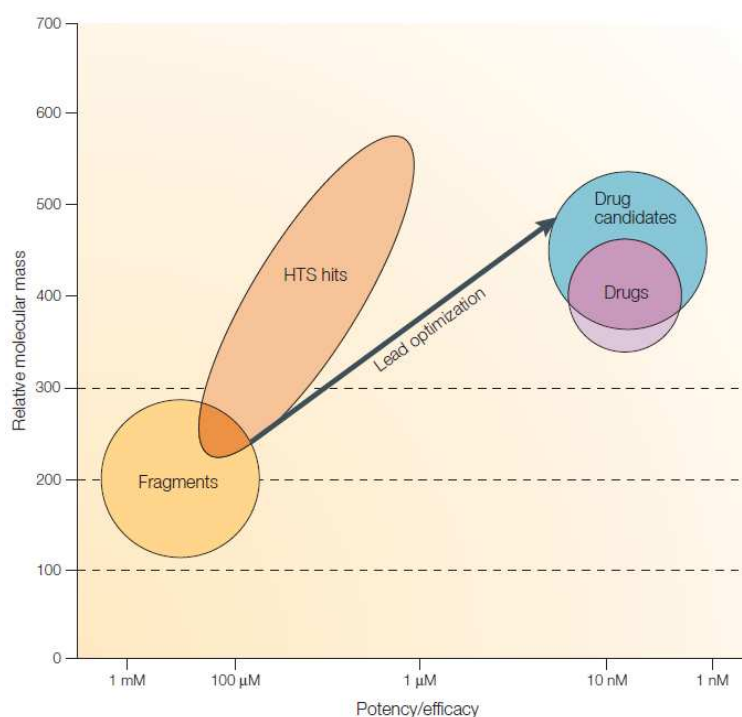


Abbildung 2: Schematische Darstellung der üblichen Molekularmassen und biologischen Aktivitäten (Potency) von Hits, gefunden im HTS- oder Fragmentscreening als Startmolekül in der Arzneistoffentwicklung (Drug) (Rees, Congreve et al. 2004).

In Anlehnung an Lipinski's „Rule of Five“ wurde von Congreve und Kollegen für die fragmentbasierte Leitstrukturentwicklung eine „Rule of Three“ vorgeschlagen. Diese beinhaltet, dass Fragmentbibliotheken, die zum Mustern vorgesehen sind, nur Moleküle enthalten sollten, die ein Molekulargewicht kleiner 300 Da, einen LogP-Wert kleiner 3 haben und deren Anzahl an Donor-, Akzeptorgruppen, so wie an rotierbaren Bindungen nicht größer als drei ist (Congreve, Carr et al. 2003).

Mittlerweile gehört der fragmentbasierte Ansatz zur Leitstruktursuche zum festen Bestandteil in der pharmazeutischen Arzneistoffentwicklung und es befinden sich zurzeit einige Arzneimittel in der klinischen Prüfung, deren Startstruktur im Fragmentscreening gefunden wurde. Als Beispiele sind hier zu nennen: von Abbott ABT-518 Inhibitor der Matrix Metalloproteinase (MMP)₁₈ in der Phase I und von Plexxikon PPM204 Inhibitor des Peroxisomen Proliferation-aktivierenden Rezeptor (PPAR) in der Phase II (Stand 2007) (Hajduk and Greer 2007).

Somit stellt der fragmentbasierte Ansatz, gepaart mit der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung, eine interessante, vielversprechende und leistungsfähige Methode dar, um neue, potente Enzyminhibitoren ausfindig zu machen.

1.1.2 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit teilt sich in drei für sich allein stehende Themengebiete auf, die aber gemeinsam in dem Gebiet der Proteinkristallographie anzusiedeln sind und den Fragmentbasierten Ansatz verfolgt.

Kernpunkt dieser Arbeit sollte es sein, im Zuge der fragmentbasierten Wirkstoffentwicklung verschiedene Sondenmoleküle mit unterschiedlichen Eigenschaften mittels Röntgenstrukturanalyse zu finden, die zum einen geeignet sind, bestimmte Bereiche in Proteinbindetaschen zu erkennen und zu charakterisieren und zum anderen, sich auf eine breite Palette verschiedener Enzyme übertragen lassen. Diese detektierten bevorzugten Bindungsbereiche (so genannte *HotSpots*) sollten dann herangezogen werden, um sie mit theoretisch, durch verschiedene Computerprogramme berechneten *HotSpots* zu vergleichen. Geeignete Computerprogramme sind hierfür GRID (Goodford 1985), DrugScore (Gohlke, Hendlich et al. 2000) oder Superstar

(Verdonk, Cole et al. 1999). Lassen sich solche, für die Bindung eines Liganden bevorzugte Bereiche in Proteinbindetaschen experimentell ausfindig machen, bilden sie wichtige Anhaltspunkte für das Design späterer Leitstrukturen.

Zuerst sollten unter Verwendung des Edelgases Xenon hydrophobe Bereiche in Enzymbindetaschen detektiert werden. Xenon wurde zu diesen Zwecken zum einen ausgewählt, da durch vorangegangene Arbeiten bekannt ist, dass Xenon mit verschiedenen Proteinen Komplexe ausbildet (Schoenborn, Watson et al. 1965; Schiltz, Fourme et al. 1995; Prangé, Schiltz et al. 1998), und dabei aufgrund seiner ähnlichen molekularen Eigenschaften vergleichbar mit einem Benzolring ist. Hinsichtlich auf den Radius (in beiden Fällen $\sim 1.4 \text{ \AA}$) und die auszubildenden Wechselwirkungseigenschaften ist. Sollte es möglich sein, Xenon im Komplex mit verschiedenen Proteinsystemen zu kristallisieren, ist es interessant zu sehen, ob es möglich ist, diese Strukturen unter Verwendung von Xenon als anomal streuendes Element zu bestimmen. Sollte dieses Vorhaben gelingen, wäre es vor allem interessant, diese Strukturen anhand von *in house* gesammelten Daten durch die Methode SAD (Single Anomalous Dispersion) zu lösen. Dieses würde zum einen kostspielige Synchrotronreisen hinfällig machen und zum anderen eine methodisch einfache und toxisch unbedenkliche Alternative zu anderen Methoden wie z.B. Selenmethionin- und Quecksilberderivaten darstellen.

Inspiziert durch die in der Mitte der Neunziger Jahre in der Gruppe von Dagmar Ringe entwickelte Methode Multi Solvent Crystal Structure (MSCS) (Allen, Bellamacina et al. 1996) sollten andere kleine Moleküle zum Charakterisieren von Proteinbindetaschen gefunden werden. Diese sollten aber im Gegensatz zur MSCS-Methode keine Lösungsmittelmoleküle beinhalten, sondern sehr gut lösliche Moleküle sein, die den Fragmenteigenschaften hinsichtlich eines Molekulargewichtes kleiner als 250 Da entsprechen.

Als drittes und letztes Thema dieser Arbeit sollte eine neue Leitstruktur am Protein 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-4-phosphat-synthase (IspD) über die Methode des fragmentbasierten Wirkstoffdesigns entwickelt werden. IspD ist das vierte Enzym im Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg, welcher in Bakterien und Pflanzen, alternativ zur Mevalonat-abhängigen Biosynthese, zur Synthese von

Isoprenoiden genutzt wird. Sollte es gelingen, eine neue Leitstruktur für IspD zu entwickeln, wäre dieses ein neues und alternatives Angriffsziel in der Antibiotikatherapie und speziell in der Therapie gegen Malaria und Tuberkulose. Obwohl die Struktur von IspD bereits 2001 von Richard und Kollegen bestimmt wurde, sollten erst einmal geeignete und reproduzierbare Kristallisationsbedingungen gefunden werden, die es erlauben, eine hohe Anzahl an Fragmenten routinemäßig durchzumustern (Richard, Bowman et al. 2001). Sollte dieses gelingen und zu dem noch die Bindung eines Fragmentes in der Bindetasche von IspD charakterisiert werden können, wäre dieses ein verheißungsvoller Ansatz zur Entwicklung einer neuen Leitstruktur gegen Malaria und Tuberkulose über Fragmentverschmelzung oder Fragmentwachstum.

2 3D-Strukturbestimmung von Proteinen; Lösen des Phasenproblems mit Hilfe von Single Anomalous Dispersion

2.1 Röntgenstrukturanalyse

In den Zellen aller lebenden Organismen treten eine Vielzahl an Makromolekülen wie z.B. Proteine, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate auf. Nukleinsäuren in der DNA kodieren das Erbgut, und Proteine oder auch Enzyme regeln alle Abläufe in den Zellen. Die Bestimmung der 3D-Strukturen dieser Makromoleküle ist von fundamentaler Bedeutung, die um verschiedene Abläufe in den Zellen zu verstehen. Sind diese Abläufe erst einmal aufgeklärt und charakterisiert, bieten sie interessante Angriffspunkte für die Arzneistoffentwicklung (McPherson 1999).

Es gibt mehrere Möglichkeiten, 3D-Strukturen von Makromolekülen aufzuklären. Die älteste und bekannteste ist die Röntgenstrukturanalyse anhand Proteinkristallen. Bereits 1958 wurde so die erste dreidimensionale Proteinstruktur vom Myoglobin aufgeklärt (Kendrew, Bodo et al. 1958). Aufgrund des stetig zunehmenden technischen Fortschritts, der Zugänglichkeit von Synchrotrons für die Proteinkristallographie, und ins besonders durch die Etablierung von Datensammlungen bei tiefen Temperaturen einem Meilenstein in der Entwicklung der Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen zur Routineuntersuchung, ist es heute möglich, Hochdurchsatz-Proteinkristallographie zu betreiben (Hope 1988; Rodgers 1994).

Bei Proteinkristallen geht man zumindest theoretisch davon aus, dass alle Moleküle im Kristall in der gleichen Konformation und Orientierung vorliegen. Bestrahlt man nun einen solchen Kristall mit Röntgenstrahlung im Wellenlängenbereich weniger Ångströmbereich, werden diese Strahlen von den einzelnen Atomen gebeugt. Die Anzahl der einzelnen Elektronen eines Atoms spiegelt deren Streukraft wieder. Je mehr Elektronen ein Atom besitzt, desto stärker ist die Intensität der Streuung des Röntgenstrahls (Dauter, Dauter et al. 2002). Unter Streuung versteht man in der Physik allgemein die Ablenkung eines Objekts durch Wechselwirkung mit einem lokalen anderen Objekt, was als Streuzentrum bezeichnet wird. Als Beispiel ist hier die Streuung von Licht an Feinstaub, von Elektronen an anderen Elektronen oder von

Neutronen an Atomkernen zu nennen. In der Quantenphysik wird unter Streuung die Emission von Licht eines Elektrons verstanden. Bei der Röntgenstrukturanalyse wird der energiereiche Röntgenstrahl von den im Proteinkristall befindlichen Atomen z.B. Kohlen-, Stick- und Sauerstoffatomen gebeugt. Befinden sich zusätzlich schwere, elektronenreiche Atome in dem Kristall, wie z.B. Quecksilber oder Xenon, können deren freie Elektronen in der äußeren Schale durch den energetischen Röntgenstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Fallen diese wieder in ihre Ausgangsposition zurück, emittieren sie dabei Strahlung gleicher Wellenlänge (James 1954). Der atomare Streufaktor f_a eines einzelnen Atoms kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$f_a = \int_V \rho(r) \exp(2\pi i S r) dr$$

ρ = Elektronendichteverteilung des atomaren Kerns; r = Radius des Atomkerns;
 S = Streuvektor = $2 \sin \theta / \lambda$; λ = Wellenlänge der Röntgenstrahl; θ = Streuwinkel.

Aufgrund der atomaren und molekularen Schwingungen muss der Streufaktor korrigiert werden, so dass gilt:

$$f_{B_a} = f_a e^{-B \left(\frac{\sin \theta}{\lambda} \right)^2}$$

$B = 8\pi^2 u^2$ stellt den isotropen B-Wert dar; u = mittlerer Auslenkungsparameter.

Somit ergibt sich, dass der B-Wert proportional zum quadratischen mittleren Auslenkungsparameter u^2 der atomaren Schwingung ist.

Bestrahlt man Proteinkristalle mit Röntgenstrahlen, werden die sich dabei aufbauenden Interferenzen der Röntgenstrahlen, durch die Atomkerne im Kristall in alle Richtungen abgelenkt. Betrachtet man den Kristall nun als eine Ebene, in welcher die Strahlenbeugung entspringt, kann man die gebeugten Strahlen durch die Millerschen Indices h , k und l charakterisieren. Die Strukturfaktoren der gebeugten Strahlen lassen sich mathematisch wie folgt ausdrücken:

$$F_{hkl} = \sum_i^n = f_a^i e^{[2\pi i (hx_i + ky_i + lz_i)]}$$

In der Einheitszelle ergibt sich aus der Summe aller Atome als Streubetrag dann:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}|e^{(i\alpha_{hkl})}$$

$|F_{hkl}|$ = Strukturfaktoramplitude der Reflektion; α_{hkl} = die Phase.

Die Elektronendichte ρ_{xyz} im Kristall kann aus der Gesamtheit aller Strukturfaktoren über Fouriertransformation berechnet werden (Bijvoet 1949):

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| e^{[-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha_{hkl}]}$$

x,y,z = Atomkoordinaten; V = Volumen der Einheitszelle.

Die Amplituden $|F_{hkl}|$ der gebeugten Röntgenstrahlen können nur als Intensität I_{hkl} gemessen werden, bei der Messung geht die Phaseninformation verloren. Es gilt aber: $I_{hkl} = |F_{hkl}|^2$.

Die Phasenwinkel α_{hkl} und somit über die Elektronendichteverteilung in der Einheitszelle, sind somit nicht direkt bestimmbar. Dieses Phänomen bezeichnet man in der Kristallographie auch als Phasenproblem (Bokhoven, Schoone et al. 1951).

Es gibt vier methodisch unterschiedliche Verfahren, um das Phasenproblem zu lösen:

- Isomorpher Ersatz (Isomorphous Replacement)
- Anomale Dispersion (Anomalous Dispersion)
- Molekularer Ersatz (Molecular Replacement)
- Direkte Methoden (Direct Methods)

Über diese Techniken kann man zu ersten Einschätzungen der Phasen und damit zur Elektronendichteverteilung in der Einheitszelle kommen, die dann durch weitere Verbesserungen zu einem Proteinmodell führen können (Blundell and Johnson 1976).

2.2 Single Anomalous Dispersion (SAD)

Die anomale Dispersion (*Anomalous Dispersion*) basiert darauf, dass der Streufaktor eines Atoms, bei gegebener Wellenlänge, im Wesentlichen von dessen Elektronenanzahl und dem Streuwinkel, relativ zum einfallenden Strahl, abhängig ist (Ramachandran and Raman 1956). Röntgenquanten können oberhalb eines definierten Energieniveaus von der Elektronenumgebung eines Atoms absorbiert und ohne

Energieverlust wieder abgegeben werden. Beim Effekt der anomalen Streuung können diese aufgenommenen Röntgenquanten aber auch zeitverzögert wieder abgegeben werden, wodurch eine Phasenverschiebung auftritt:

$$f = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda)$$

f = Streufaktor; f_0 = Thomsenstreuung; f' = Korrektur von f_0 in Abhängigkeit von λ des Röntgenlichtes; f'' = Phasenverschobener Beitrag (anomaler Betrag); i = für die Phasenverschiebung verantwortliche imaginäre Teil. Zum besseren Verständnis ist die obige Formel noch einmal graphisch in Abbildung 3 dargestellt:

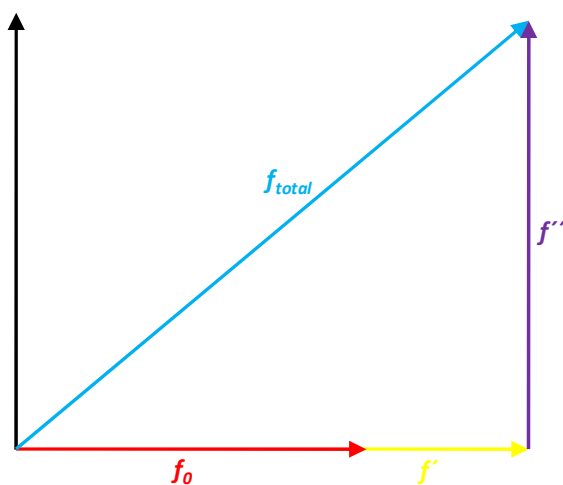


Abbildung 3: Graphische Darstellung der anomalen Streuung eines Atoms als Vektordiagramm. f = Streufaktor; f_0 = Thomsenstreuung; f' = Korrektur von f_0 in Abhängigkeit von λ des Röntgenlichtes; f'' = Phasenverschobener Beitrag (anomaler Betrag)

Die anomale Dispersion ist abhängig von der Masse des streuenden Atoms und von der Wellenlänge der durch die Röntgenquelle erzeugten Strahlung. An der entsprechenden Absorptionskante eines Elementes ist dieser Effekt am stärksten. Bei vielen Synchrotron-Beamlines lässt sich ein weites Spektrum an Wellenlängen gewünschter monochromatischer Frequenzen herausfiltern. Dadurch ist es möglich, an die Absorptionskanten von Elementen der vierten oder höheren Periode des Periodensystems der Elemente heranzufahren. Aufgrund der Tatsache, dass *in house* verwendete Röntgenapparaturen in der Regel eine Kupfer-Drehanode als Röntgenstrahlquelle mit konstanter Wellenlänge ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) besitzen, lassen sich die Absorptionskanten der Elemente, die als anomale Streuquelle in der makromolekularen Kristallographie routinemäßig eingesetzt werden, nicht erreichen.

Jedoch ist es möglich, mit Elementen der fünften oder höheren Periode des Periodensystems der Elemente hohe Werte für f'' zu erzielen (Abbildung 4). Aufgrund seiner hohen Masse, sowie der einfachen und unproblematischen Handhabung stellt das Edelgas Xenon einen hervorragenden Kandidaten zur Strukturbestimmung von Makromolekülen mittels SAD anhand von *in house* gesammelten Daten dar:

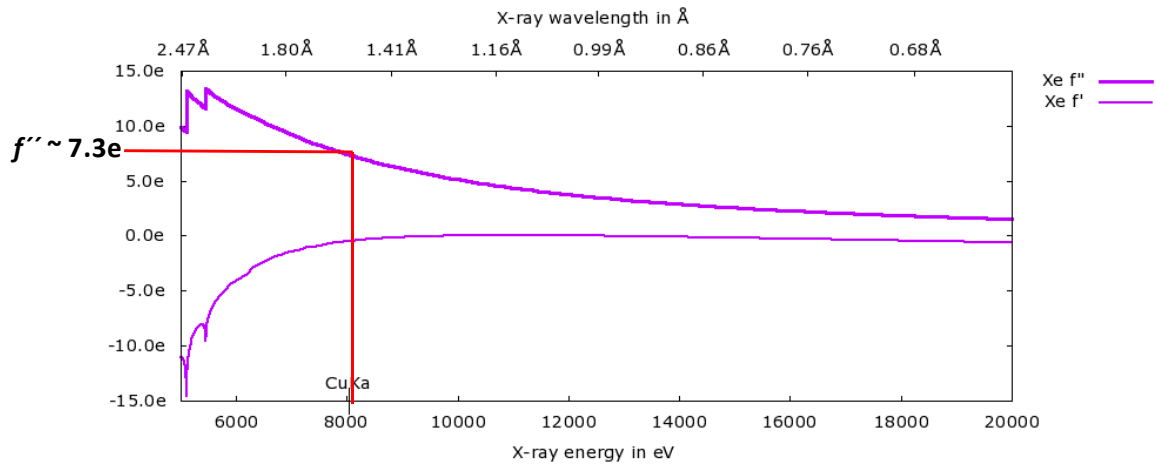


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Werte für f' und f'' eines Xenonatoms bei $\lambda = 1.54178 \text{ Å}$.
 Quelle: <http://www.bmsc.washington.edu/scatterer>.

Die Strukturfaktoramplitude eines anomal streuenden Atoms lässt sich mit folgender Gleichung zusammenfassen:

$$|F^\pm|^2 = |F_T|^2 + \frac{f''^2 + f'^2}{f_0^2} |F_A|^2 + 2 \frac{f'}{f_0} |F_T| |F_A| \cos \alpha \pm 2 \frac{f''}{f_0} |F_T| |F_A| \sin \alpha$$

$|F_A|$ ist die mit anomalem Beitrag und $|F_T|$ ist die ohne anomalen Beitrag abgeleitete Strukturfaktoramplitude; α ist der Phasenwinkel zwischen $|F_A|$ und $|F_T|$. Anhand dieser Gleichung kann über SAD die Phasenverschiebung berechnet werden.

Das Friedel-Gesetz besagt, dass die Intensitäten der Strukturfaktoramplitude bei der Röntgenstrahlbeugung in Bezug auf die Millerschen Indices hkl und $-h-k-l$ identisch sind. Es besteht eine Spiegelsymmetrie oder auch Friedel-Symmetrie:

$$|F_{hkl}| = |F_{(-h-k-l)}|$$

Diese gilt jedoch nur bei normaler Diffraktion. In der Gegenwart eines Schweratoms, ist dieses Gesetz gebrochen. Die Amplituden der Friedelpaare hkl und $-h-k-l$ sind nicht länger identisch.

$$|F_{hkl}| \neq |F_{(-h-k-l)}|$$

Aufgrund der Phasenverschiebung von f'' und der Ungültigkeit des Friedelgesetzes kann durch die Differenz der Intensitäten, auf die Position des anomal streuenden Atoms geschlossen werden. Dadurch ist es möglich die Phasen der Strukturfaktoren näherungsweise zu ermitteln, wodurch diese Methode erlaubt, das Phasenproblem zu lösen und somit die Elektronendichte in der Einheitszelle zu berechnen (Rossmann 1961).

Bei SAD-(single-anomalous-dispersion) arbeitet man im Gegensatz zu MAD-(multiple-anomalous-dispersion) Experimenten nur mit einer Wellenlänge (Hendrickson and Teeter 1981; Wang, Wyckoff et al. 1985). Beide Methoden beruhen auf dem Prinzip der anomalen Dispersion. Da bei beiden Verfahren zum Aufnehmen von Datensätze jeweils nur ein Kristall ausreicht, sind die gesammelten Daten, bei dieser Art der Strukturlösungsmethode, isomorph. Weil die Intensitätsunterschiede allerdings oft sehr schwach sind, müssen die Daten mit hoher Genauigkeit gemessen werden. Dieses kann durch Sammeln hochredundanter Daten gewährleistet werden (Gonzalez, Pedelacq et al. 1999). Weiter sind die ersten erhaltenen Elektronendichten oft von schwacher Qualität, so dass sie durch Dichtemodifikation verbessert und interpretierbare Elektronendichten erhalten werden können.

3 Zielstrukturen

Im Folgenden sollen alle Enzyme, die im Zuge dieser Arbeit als Zielstrukturen untersucht wurden, kurz in ihrer Bedeutung, ihrem Aufbau und ihrer Eigenschaften erläutert werden.

3.1 Thermolysin

3.1.1 Einleitung

Die Endopeptidase Thermolysin (E.C.3.4.24.27) gehört zu der Gruppe der Metalloproteasen. Metalloproteasen besitzen in der Bindetasche ein katalytisch aktives Metallion, wodurch sie sich von anderen Proteasen, wie z.B. Serin-, Aspartyl- oder Cysteinproteasen unterscheiden. 31 Familien von Metalloproteasen sind mittlerweile bekannt. Thermolysin zählt man zur M4 Familie dieser Protease-Gruppe (The Universal Protein Resource (UniProt) 2007). Wie auch Thermolysin enthält ein Großteil anderer Metalloproteasen ein Zinkion im aktiven Zentrum. Dieses wird durch ein für diese Proteasen typisches Sequenzmotiv (- HEXXH -) koordiniert. Die endoproteolytische Aktivität von Thermolysin beruht auf dem Abtrennen von großen hydrophoben Aminosäuren wie z.B. Leucin oder Valin (Moriyama 1967). Andere Mitglieder der M4 Familie der Metalloproteasen sind als Schlüsselenzyme in der Pathogenese unterschiedlicher Krankheiten bekannt. Als Beispiele sind hier die thermolysinähnlichen Proteasen von *Helicobacter pylori* oder *Vibrio cholerae* zu nennen, welche bei der Entstehung von Gastritis oder Cholera mitverantwortlich sind (Booth, Boesman-Finkelstein et al. 1983; Smith, Chahal et al. 1994). Obwohl Thermolysin nicht direkt an pathogenen Prozessen im Menschen beteiligt ist, besitzt es eine enorme Wichtigkeit für die Arzneistoffentwicklung. Denn durch die Tatsache, dass bis heute mehr als 200 Enzyme bekannt sind, die zu der M4 Familie der Metalloproteasen gehören, aber nur die Struktur dreier weiterer Mitglieder bekannt ist, dient Thermolysin als Prototyp für Zinkproteasen dieser Art. Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* war das erste Enzym der M4 Familie, dessen dreidimensionale

Struktur bestimmt werden konnte (Matthews 1972). In den letzten 35 Jahren ist Thermolysin von daher genauestens studiert und charakterisiert worden. Die anderen drei Enzyme der M4 Familie, deren Strukturen bestimmt werden konnten, sind Pseudolysin von *Pseudomonas aerolysis* (Thayer, Flaherty et al. 1991), Thermolysin von *Bacillus cereus* (Stark, Pauptit et al. 1992) und Aureolysin von *Staphylococcus aureus* (Banbula, Potempa et al. 1998). Die enorme Bedeutung von Thermolysin als Modellsystem für pharmazeutische wichtige Proteasen, wie z. B. das Angiotensinkonvertierende Enzym (ACE) oder die Matrix Metalloproteasen, zeigt die Vielzahl der bis heute veröffentlichten wissenschaftlichen Studien (Harrison, Chang et al. 1992; Whittaker, Floyd et al. 1999; Patchett and Cordes 2006).

3.1.2 Tertiäre Struktur von Thermolysin

Die tertiäre Struktur von Thermolysin besteht aus zwei Domänen. Diese formen eine Vertiefung, in der sich das aktive Zentrum mit dem katalytischen Zinkion befindet. Der N-Terminus besteht sowohl aus α -Helices als auch aus β -Faltblättern. Im Gegensatz hierzu weist der C-Terminus vorwiegend Helices auf. Insgesamt setzt sich Thermolysin aus 316 Aminosäuren, 4 Kalziumionen und einem Zinkion zusammen. Die Kalziumionen sind für die Thermostabilität des Enzyms verantwortlich sind (Drucker and Borchers 1971). Das aktive Zentrum lässt sich zusätzlich nochmals in weitere Bereiche gemäß den Untersuchungen von Schlechter und Berger unterteilen (Schechter and Berger 1967). Insgesamt prägen drei individuelle Untertaschen, so genannte *Subpockets*, das Bild der Bindetasche von Thermolysin (Abbildung 5).

Als wichtigste Tasche und somit als Spezifitätstasche wäre die S1'-Tasche zu nennen. Diese sehr hydrophobe Kavität ist für die Substraterkennung wichtig und wird vornehmlich von hydrophoben Resten wie z.B. Leucin, Isoleucin, Valin oder Phenylalanin besetzt. Zusätzlich befindet sich auch noch Arg 203 in der S1'-Tasche, welches wiederum Wasserstoffbrückenbindungen zu hydrophilen Gruppen, z.B. einer Carbonylgruppe, ausbilden kann. Eine weitere, eher hydrophobe Tasche ist die S2'-Tasche, welche sich direkt an die S1'-Tasche anschließt. Im Gegensatz zu der vorher erwähnten S1'-Spezifitätstasche binden Liganden eher unspezifisch in der

S2'-Tasche. Aber auch hier befinden sich Aminosäuren, wie Asn 112 und Ala 113, die über ihre Säureamid- bzw. Carbonylgruppe Wasserstoffbrücken zu den jeweiligen Liganden ausbilden können. Als letztes wäre da noch die S1-Untertasche zu nennen, die sehr groß und Lösungsmittel exponiert ist und von daher auch eher unspezifisch Liganden bindet.

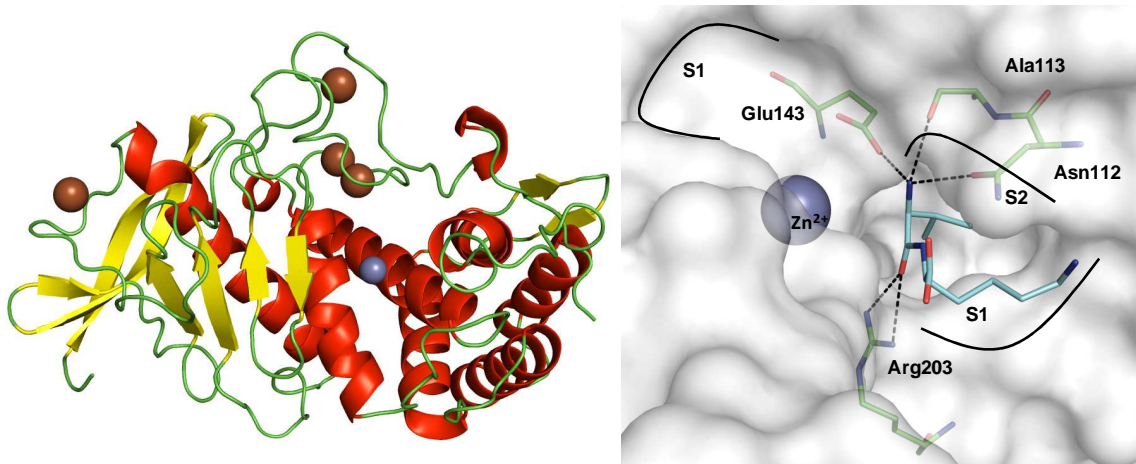


Abbildung 5: Tertiärstruktur von Thermolysin (links) mit seinem aktiven Zentrum (rechts). Links ist die Tertiärstruktur dargestellt als Cartoonmodell. Neben dem katalytisch aktiven Zink (pink) sind auch die für die Thermostabilität verantwortlichen Kalziumionen (braun) wiedergegeben. Rechts ist das aktive Zentrum mit den Untertaschen S1' und S2' zu sehen. In der Bindetasche befindet sich das durch Autoprotolyse entstehende Dipeptid Val-Lys (hellblau), welches über die für die Bindung charakteristischen Aminosäuren Glu 143, Ala 113, Asn 112 und Arg 203 koordiniert ist. Die Aminosäuren und das Dipeptid sind im „stick“-Modus repräsentiert, wobei Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot dargestellt sind (PDB 8TLN) (Holland, Tronrud et al. 1992).

3.1.3 Katalytischer Mechanismus von Thermolysin

Der katalytische Mechanismus von Thermolysin (Abbildung 6) ist der am besten untersuchte Katalysemechanismus aller Metalloproteasen (Kester and Matthews 1977; Holden and Matthews 1988). Im nativen Zustand ist das Zinkion über die Aminosäuren His 142, His 146 und Glu 166 und ein Wassermolekül tetraedrisch koordiniert. Nachdem das zu hydrolisierende Peptid gebunden hat, wird das an der Koordination beteiligte Wassermolekül von Glu 143 und dem Zinkion stark polarisiert [A]. Daraufhin erfolgt der nukleophile Angriff des Wassers auf die Peptidbindung [B]. Ein Proton des Wassers wird durch Glu 143 auf den peptidischen Stickstoff übertragen und es entsteht ein trigonal bipyramidaler Übergangszustand. His 231 und Tyr 157 dienen der

Stabilisierung des peptidischen Carbonylsauerstoffs. Im Anschluss erfolgt die Spaltung der Peptidbindung, wobei das zweite vom Wasser stammende Proton ebenfalls von Glu 143 auf das Stickstoffatom übertragen wird. Das Aminprodukt verlässt das aktive Zentrum in protonierter Form [C]. Das Carboxylprodukt wird durch ein neues Wassermolekül ersetzt [D], so dass das Zinkion wieder tetraedrisch koordiniert vorliegt.

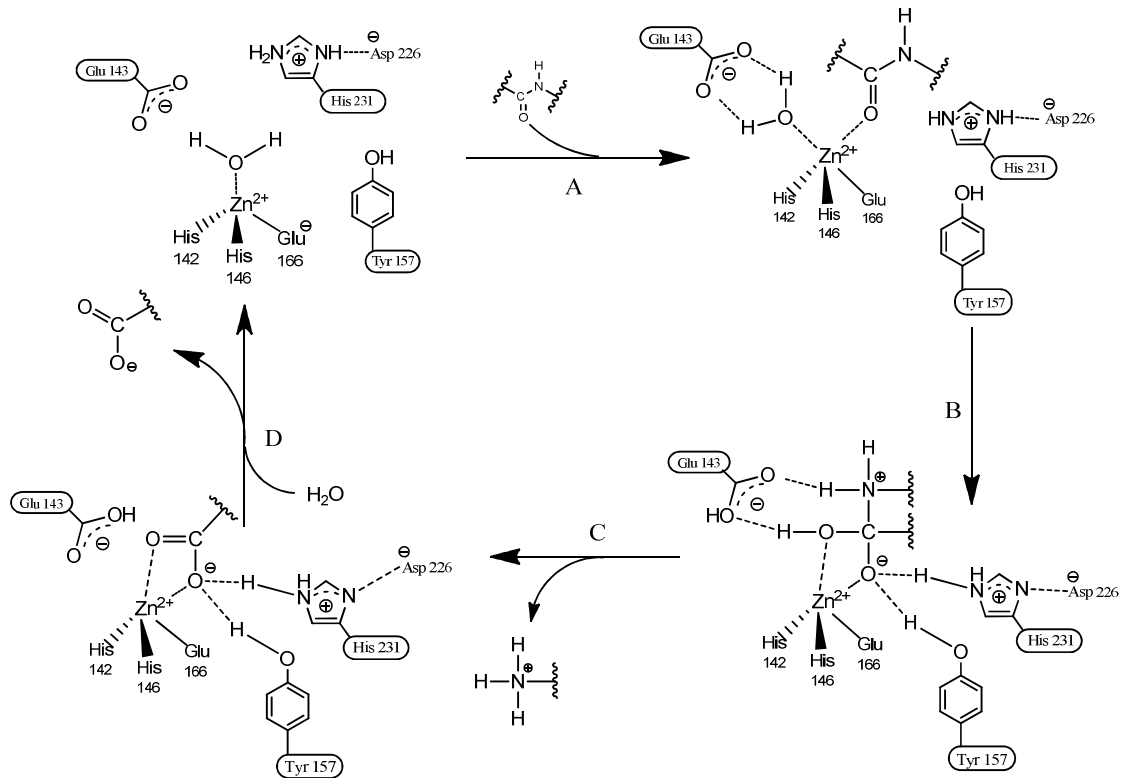


Abbildung 6: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus von Thermolysin. A) Peptidbindung und Polarisation des Wassermoleküls. B) Protonübertragung auf das Peptid durch Glu 143, Entstehung des trigonal bipyramidalen Übergangszustands. C) Spaltung der Amidbindung. Das Amidprodukt verlässt das aktive Zentrum. D) Ersetzung des Carboxylproduktes durch ein Wassermolekül.

3.2 tRNA-Guanin Transglykosylase

3.2.1 Einleitung

Das Enzym tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT, EC 2.4.2.29) stellt ein potentielles Ziel zur Entwicklung neuer selektiver Wirkstoffe für die Therapie der Bakterienruhr (Shigellose) dar. Dabei handelt es sich um eine durch *Shigellen* hervorgerufene, fäkal oral übertragene und extrem ansteckende, entzündliche Darmerkrankung, die mit Fieber, krampfartigen Koliken und wässriger, blutiger Diarrhoe einhergeht. Die große Gefahr dieser Krankheit besteht in dem durch den Durchfall ausgelösten Elektrolytverlust, der über Nierenversagen und Koma bis hin zum Tod führen kann. Jährlich werden vorwiegend in Entwicklungsländern ca. 165 Millionen Erkrankungen registriert, von denen eine Million tödlich verläuft (Stengl 2006).

Die bakterielle TGT ist an der Biosynthese der hypermodifizierten tRNA-Base Queuin (Q) beteiligt. Das Enzym katalysiert den Austausch des genetisch kodierten Guanins an Position 34 (der "Wobble-Position") von Asp-, Asn-, His- und Tyr- spezifischen tRNAs durch die prämodifizierte Base 7-Aminomethyl-7-deazaguanin (preQ₁). Die Biosynthese dieser Q-Vorstufe beginnt mit Guanosintriphosphat (GTP) und erfordert die Aktivitäten der *folE*-, *queD*-, *queE*-, *queC*- und *queF*-Genprodukte. Nach dem Einbau von preQ₁ in die tRNA erfolgt die weitere Modifikation zur Q-Base durch das *queA*-Genprodukt und ein bisher nicht identifiziertes Enzym, das jedoch offensichtlich Vitamin B₁₂ als Cofaktor benötigt.

Durand et al. (2000) zeigten, dass eine funktionelle TGT für die Pathogenese von *Shigellen* erforderlich ist (Durand, Dagberg et al. 2000). Inaktivierung des *tgt*-Gens führt dazu, dass die *virF*-mRNA, welche die genetische Information für einen positiven Transkriptionsregulator enthält, nicht mehr effizient translatiert wird. Wenn die Konzentration an VirF jedoch einen bestimmten Schwellenwert unterschreitet, wird eine Vielzahl von Pathogenitätsgenen nicht mehr exprimiert und *Shigella* verliert weitgehend seine Fähigkeit, eine Krankheit auszulösen (Abbildung 7).

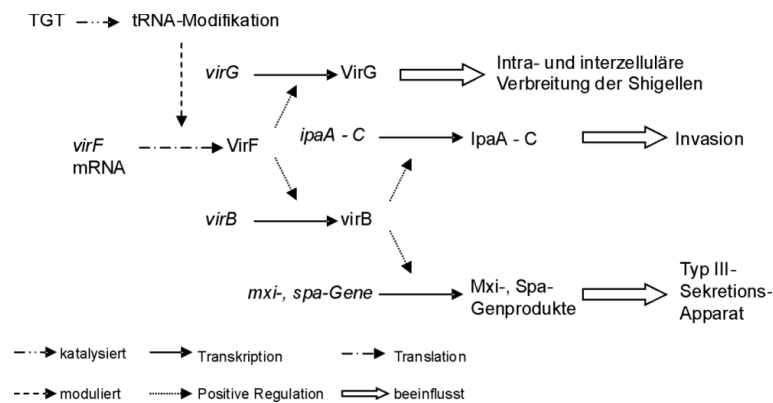


Abbildung 7: Rolle der TGT in der Pathogenität der Shigellen. VirF ist ein übergeordnetes Regulatorprotein, das bei der Ausbildung des virulenten Phänotypen eine entscheidende Rolle spielt. Für die Translation der *virF*-mRNA sind modifizierte tRNAs notwendig. Das Enzym TGT ist an einer solchen Basenmodifikation beteiligt (Brenk 2002).

3.2.2 Tertiäre Struktur der tRNA-Guanin Transglykosylase

Eine Voraussetzung für rationales Wirkstoffdesign ist die Kristallstruktur des ausgewählten Zielproteins. Da die TGT aus *Shigella* bisher einer erfolgreichen Kristallisation entzog, wurde die Struktur des orthologen Enzyms aus dem Bakterium *Zymomonas mobilis* bestimmt. Die Kristallstruktur gelang im Komplex mit der Queuinvorstufe preQ₁ (Romier, Reuter et al. 1996). Obwohl die Sequenzidentität beider Enzyme lediglich 52 % beträgt, unterscheiden sich ihre Bindetaschen lediglich im Austausch einer einzelnen Aminosäure. Die TGT von *Z. mobilis* besitzt an Position 106 ein Tyr anstelle eines Phe im Vergleich zu *S. flexneri* (Romier, Meyer et al. 1997). Von Brenk et al. (2003) wurde jedoch gezeigt, dass dieser Aminosäureaustausch keinerlei Auswirkung auf die katalytischen Eigenschaften des Enzyms hat. Bei dem Enzym handelt es sich in katalytisch aktiver Form um ein Homodimer, wobei jede Untereinheit aus 385 Aminosäuren besteht und ein Zinkion gebunden hat. TGT gehört zur Familie der (α/β)₈-Fassenzyme (TIM-Barrel). Wie in Abbildung 8 zu erkennen, sind die beiden TGT-Monomere über eine 2-zählige Drehachse miteinander verbunden. Die Guanosin34-Bindetasche und das aktive Zentrum befinden sich auf der C-terminalen Seite des Fasses. In direkter Nachbarschaft liegen Kavitäten, die die tRNA-Nucleoside Uridin 33 und Uridin 35 spezifisch binden. Die Subtaschen für Uridin 33 und 35 sind weitestgehend flach und lösungsmittel exponiert. Im Gegensatz dazu ist die Bindetasche,

die Guanosin 34 aufnimmt, sehr tief. Kristallstrukturen haben gezeigt, dass aus sterischen Gründen von einem TGT-Dimer gleichzeitig nur ein tRNA-Molekül gebunden werden kann. Dabei findet im aktiven Zentrum des einen Monomers der Basenaustausch von Guanin zu preQ₁ statt, während das andere Monomer wohl hauptsächlich über seine Zink-bindende Subdomäne die tRNA-Bindung stabilisiert (Xie, Liu et al. 2003).

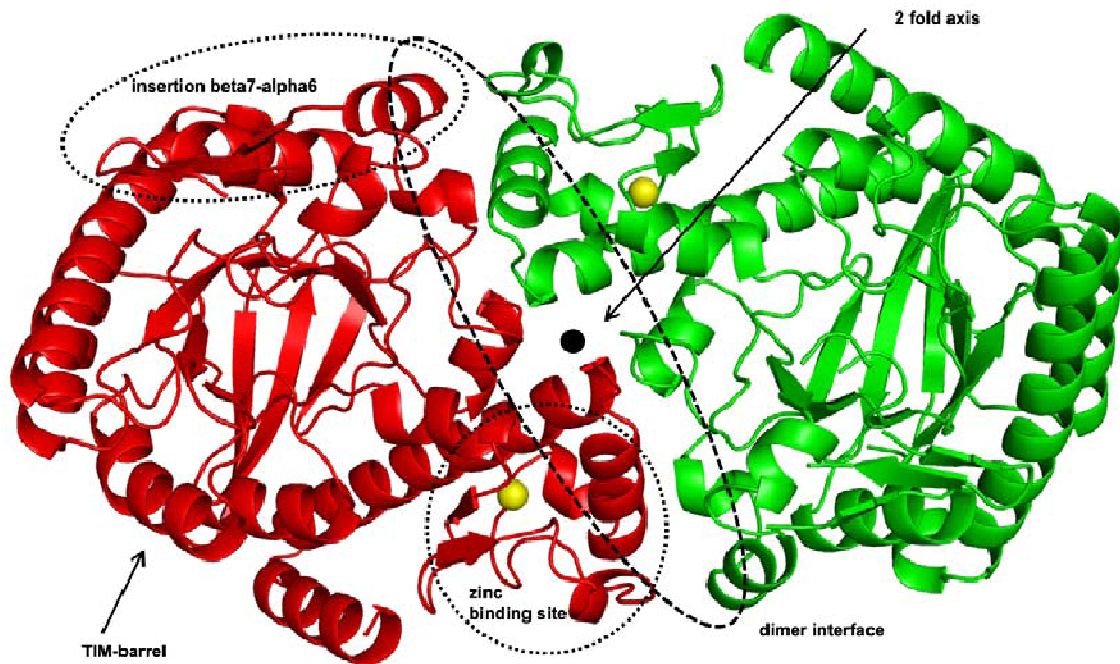


Abbildung 8: Tertiärstruktur der TGT. Zu erkennen sind das Monomer1 (rot) und Monomer2 (grün), welche über eine Drehachse das Dimer bilden. Die Drehachse befindet sich inmitten der Kontaktflächen des Dimers (dimer interface). Weiter sind noch der für die Substraterkennung spezifische Abschnitt „beta7-alpha6-insertion“ und die Zink Koordinationsstelle sowie das für die Familie charakteristische TIM-Barrel eingezeichnet (Ritschel 2009).

3.2.3 Katalytischer Mechanismus der tRNA-Guanin Transglykosylase

Aus den von der TGT ermittelten Kristallstrukturen sowie aus biochemischen Studien leitet sich eine Basenaustauschreaktion ab, die einem Ping-Pong-Mechanismus entspricht (Abbildung 9). Zunächst bindet die tRNA an das Enzym, woraufhin die glycosidische Bindung von Guanosin 34 durch einen nukleophilen Angriff von Asp 280 am C1-Kohlenstoff des Riboseringes gespalten wird. Die Folge ist ein kovalentes TGT-tRNA-Intermediat. Nachdem das ausgeschnittene Guanin aus der Bindetasche

diffundiert ist, wird es durch preQ₁ ersetzt. Die Aufnahme der Substratbase in der Bindetasche erfordert einen "Peptidflip" der Leu 231/Ala 232-Peptidbindung. Die preQ₁-Base wird dann in umgekehrter Reaktionsfolge in die tRNA eingebaut.

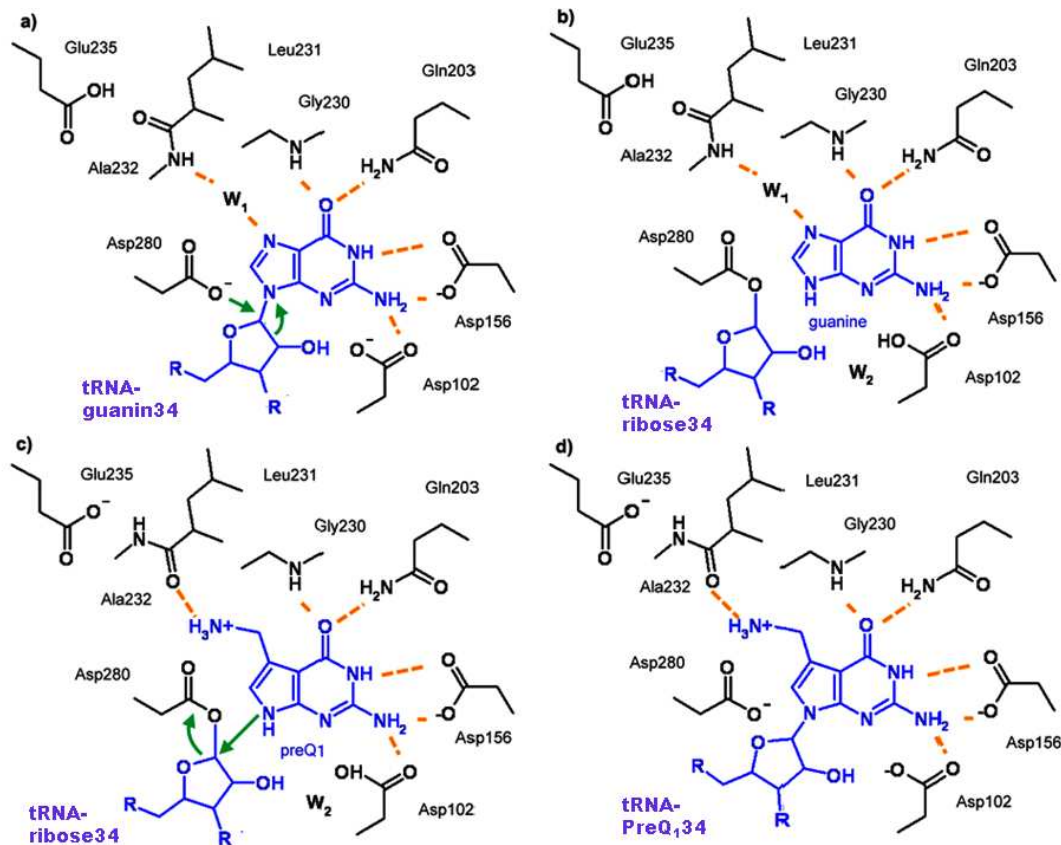


Abbildung 9: Mechanismus der Basenaustauschreaktion in der TGT (Ritschel 2009). a) Bindung der tRNA über Guanin mit anschließendem Herausklappen des Ribosebausteins aus dem tRNA-Molekül. Basenerkennung durch Asp 102, Asp156, Gln 203, Gly 230 und Leu 231. Nukleophile Spaltung der Ribosebindung durch Asp 280. b) Brechen der C1-N-Bindung und Verlassen des Guanins der TGT-Bindetasche. c) Umklappen der Peptidbindung zwischen Leu 231 und Ala 232 und Ersetzen des Guanins durch preQ₁. d) Kovalente Verknüpfung des preQ₁ mit dem Ribosebaustein, Lösen der kovalenten Verknüpfung zu Asp 280. (Stengl, Reuter et al. 2005).

3.3 cAMP abhängige Proteinkinase

3.3.1 Einleitung

Bei der cAMP abhängigen Proteinkinase (EC. 2.7.11.11) oder besser bekannt als Proteinkinase A (PKA), handelt es sich wie der Name schon sagt, um eine vom zyklischen AMP als *second messenger* abhängigen Kinase (Smith, Francis et al. 1993). Kinasen übertragen eine Phosphatgruppe von ATP auf Serin, Threonin oder Tyrosin des jeweiligen Zielproteins. Durch die Aktivierung verschiedener Enzyme sind Kinasen somit indirekt an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie, z. B. der Transkription (Huggenvik, Collard et al. 1991), den Energiestoffwechsel (Hubbard and Cohen 1993) oder der Apoptose (Gjertsen and Døskeland 1995) beteiligt. Insgesamt geht man davon aus, dass es 518 verschiedene humane Proteinkinasen gibt, was 1,2 % des menschlichen Genoms entsprechen würde (Manning, Whyte et al. 2002).

Die PKA liegt im inaktiven Zustand als Heterotetramer vor. Dieses besteht einerseits aus zwei katalytischen C- und zum anderen aus zwei regulatorischen R-Untereinheiten (R_2C_2). Die R-Untereinheiten besitzen eine hohe Affinität zu cAMP und haben eine Masse von ca. 43 – 45 kDa. Die C-Untereinheiten verfügen dagegen über eine Masse von 40 kDa und Bindungsplätze für das Substrat und das Coenzym ATP (Taskén, Skâhegg et al. 1993). Die Aktivierung der C-Untereinheit der PKA folgt über eine Konformationsänderung, die dadurch hervorgerufen wird, dass zwei Moleküle cAMP an jeder R-Untereinheit binden. Die nun aktivierte C-Untereinheit ist in der Lage das jeweilige Substrat sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, der aufgrund des Größenunterschiedes für die R-Untereinheit nicht zugänglich ist, zu phosphorylieren. Die katalytisch aktiven C-Untereinheiten interagieren nicht miteinander. Abgesehen von der Aktivitätsregulierung durch cAMP dient die R-Untereinheit auch der Lokalisation des Heterotetramers an Zellorganellen und an der zellulären Matrix durch Bindung an so genannten A-Kinase-Ankerproteinen (Carlson, Witczak et al. 2001; Smith, Langeberg et al. 2006).

Insgesamt existieren beim Menschen 11 Isoenzyme der katalytischen C-Untereinheit. Die Isoenzyme unterscheiden sich zum einen strukturell im Amino- und Carboxy-

Terminus und zum anderen durch ihr Vorkommen in verschiedenen Geweben, z.B. im Herz, Gehirn oder lymphoiden Gewebe (Uhler, Chrivia et al. 1986).

Die Proteinkinase A gilt als die am besten, sowohl biologisch als auch strukturell untersuchte Kinase. Sie wird deswegen häufig als Modellsystem in der Arzneistoffentwicklung herangezogen (Davies, Reddy et al. 2000).

3.3.2 Tertiärstruktur der C-Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase

Die katalytische C-Untereinheit der Proteinkinase A enthält insgesamt 350 Aminosäuren und besteht aus zwei Domänen. Die kleinere N-terminale Domäne besteht hauptsächlich aus β -Faltblättern, wohingegen die größere C-terminale Domäne eine Vielzahl an α -Helices besitzt. Das katalytische Zentrum liegt zwischen diesen beiden Domänen in einer eher hydrophoben Tasche (Abbildung 10). Die N-terminale Domäne bildet das Kernstück aller Kinasen und bindet den Cofaktor ATP. Dieser eher konservierte Bereich ist bei allen Kinasen ähnlich und folgt der Sequenz Arg-Arg-X-Ser[Thr]-Y. X kann jede kleine Aminosäure darstellen, wohingegen Y eine Gruppe hydrophober Aminosäuren symbolisiert (Taylor, Buechler et al. 1990). Die C-terminale Domäne bindet das Substratprotein. Die ATP-Bindetasche in der kleineren β -faltblattreichen Domäne, stellt wiederum für Kinasen einen charakteristischen Bereich dar. Es handelt sich dabei um die so genannte „*hinge region*“, eine sehr glycinreiche Schleife, mit dem Motiv Gly-X-Gly-X-X-Gly, die für alle Kinasen gleich ist (Knighton, Zheng et al. 1991; Knighton, Bell et al. 1993). Die *hinge region* schließt die Base Adenin ein und hält somit das ATP in Position. Der Adeninring wird in der hydrophoben Tasche über van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidgruppen der Glycinreste fixiert.

Die Flexibilität beider Domänen zueinander vermittelt die „offene“ bzw. „geschlossene“ Konformation. Bindet ATP an ein Substrat, verdrehen sich die Untereinheiten gegeneinander, sodass die γ -Phosphatgruppe des ATP in die Nähe der zu phosphorylierenden Aminosäure zu liegen kommt und die Transferreaktion stattfinden kann.

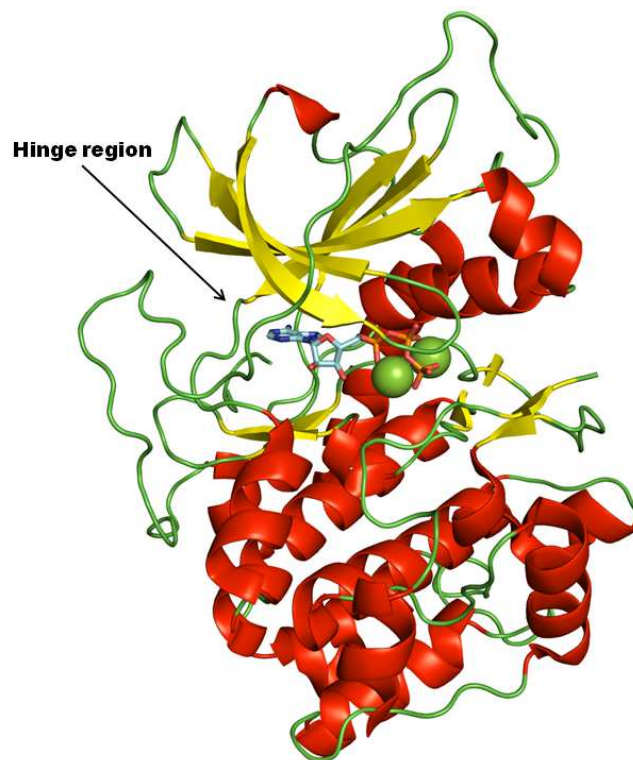


Abbildung 10: Tertiärstruktur der cAMP abhängigen Proteinkinase A dargestellt als Cartoonmodell (α -Helices rot; β -Faltblätter gelb und Schleifen grün) mit ATP (hellblau) und zwei Magnesiumionen (grün) im aktiven Zentrum. (PDB Code 1ATP; (Zheng, Trafny et al. 1993) .

3.3.3 Katalytischer Mechanismus der Proteinkinase A

Bindet cAMP an die Proteinkinase A, zerfällt das inaktive Tetramer in ein R_2 -Dimer und zwei katalytisch aktive Untereinheiten. An die katalytische C-Untereinheit bindet sowohl der Cofaktor ATP als auch das Substratprotein. Auf einen jeweiligen Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest des Substratproteins wird eine von ATP stammende Phosphatgruppe übertragen (Abbildung 11). In der Initiierungsphase, wenn das ATP gebunden hat, stabilisieren Lys 72 und Asp 184 die Phosphatgruppen. Lys 72 formt dabei Wasserstoffbrücken zum α - und β -Phosphat, wohingegen die γ -Phosphatgruppe von Asp 182 mit Hilfe eines Magnesiumions chelatiert wird. Die γ -Phosphatgruppe wird dadurch in erreichbare Nähe des zu phosphorylierenden Serins des Substratproteins gebracht. Lys 168 neutralisiert dabei die negative Ladung des Phosphatrestes in γ -Position. Die Phosphatgruppenübertragung findet nun in zwei Phasen statt. Nachdem Asp 166 das Proton vom „Target“-Serin aufgenommen hat,

kommt es zu einem pentavalenten Übergangszustand zwischen dem Serin und der γ -Phosphatgruppe (Übertragungsphase). Anschließend wird die Phosphodiesterbindung zwischen der β - und γ -Phosphatgruppe gebrochen. Die so entstandenen Produkte ADP und das phosphorylierte Serin des Substratproteins können nun in der Endphase das aktive Zentrum wieder verlassen (Davies, Reddy et al. 2000).

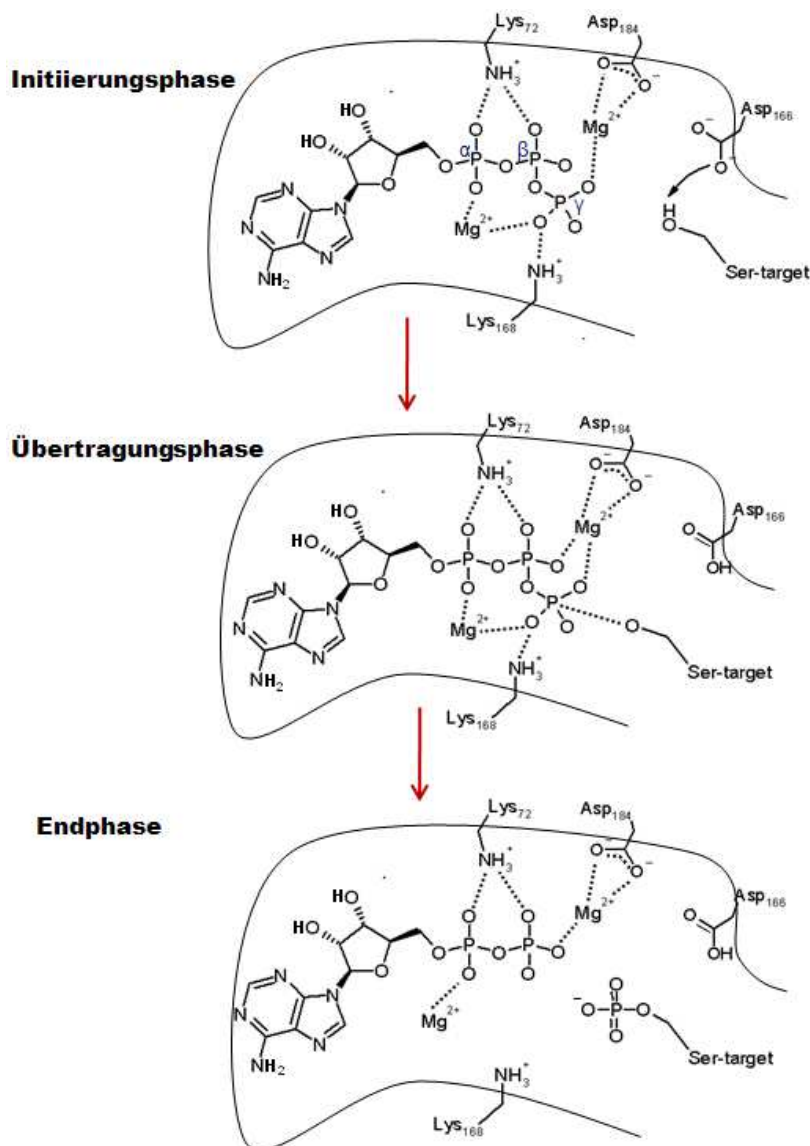


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Phosphatübertragung in Kinasen am Beispiel der PKA. Initiierungsphase: Bindung von ATP. Stabilisierung des ATPs durch Lys 72 und Asp 184. Übertragungsphase: Entstehung eines pentavalenten Übergangszustand zwischen der γ -Phosphatgruppe und dem Target-Serin. Endphase: Brechen der Phosphatdiesterbindung und Verlassen der Bindetasche des ADPs.

3.4 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Synthase

Das Enzym 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Synthase (IspD) wurde ebenfalls im Zuge des Fragmentbasierten Ansatz untersucht und soll somit an dieser Stelle erwähnt werden. Der Tatsache Rechnung tragend, dass zu IspD noch keine Leitstrukturen vorhanden sind, wurde dieses Enzym aufgrund seiner Bedeutung in der Therapie gegen Malaria und Tuberkulose intensiv untersucht. Details zu diesen Untersuchungen sowie zu dem Enzym selbst können dem Kapitel 6 entnommen werden.

3.5 D-Xyloseisomerase

3.5.1 Einleitung

Das Enzym D-Xyloseisomerase (EC.5.3.1.5) katalysiert zum einen *in vivo* die Gleichgewichtsreaktion zwischen D-Xylose zu D-Xylulose und zum anderen *in vitro* von D-Glukose zu D-Fruktose (Hochster and Watson 1954). Der systematische Name dieses Enzyms ist D-Xylose-Aldose-Ketose-Isomerase. In der Literatur wird das Protein auch noch unter dem Namen D-Xyloseisomerase, D-Xyloseketomerase und D-Xyloseketolisomerase aufgeführt. In Anlehnung an den in der Literatur am häufigsten verwendeten Namen wird in dieser Arbeit ausschließlich die Bezeichnung D-Xyloseisomerase (DXI) verwendet.

DXI wurde bisher aus weit mehr als 100 Organismen isoliert und kommt überwiegend in Bakterien vor, die auf Xylose wachsen (Chen, Anderson et al. 1979). Weiter wurde DXI aber auch in Pilzen (Banerjee, Archana et al. 1994) und vereinzelt in Pflanzen gefunden (Kristo, Saarelainen et al. 1996). Die Gruppe der Xyloseisomerasen lassen sich aufgrund ihrer Größe, ihrer Sequenz und ihrer zweiwertigen Kationen in zwei Klassen einteilen. Zur Klasse I DXIs gehören die Enzyme der Gattungen *Streptomyces* (Gaikwad, Rao et al. 1993), *Actinoplanes* (Lambeir, Lauwereys et al. 1992), *Thermus* (Chang, Park et al. 1999) und *Arthrobacter* (Rangarajan, Asboth et al. 1992). Deren Polypeptidkette besteht in der Regel aus 380 bis 390 Aminosäuren mit einer

wechselseitigen Identität von 60 %. DXIs der Klasse II verfügen dagegen über 440 bis 460 Aminosäuren mit einer Sequenzidentität (von über 50 %). Hierzu gehören Enzyme der Gattungen *Klebsiella* (Feldmann, Sahm et al. 1992), *Escherichia* (Lawlis, Dennis et al. 1984), *Lactobacillus* (Bor, Moraes et al. 1992), *Lactococcus* (Erlandson, Park et al. 2000), *Clostridium* (Meaden, Aduse-Opoku et al. 1994), *Bacillus* (Rasmussen, Cour et al. 1994), *Staphylococcus* (Sizemore, Buchner et al. 1991) und *Thermoanaerobacter* (Liu, Wiegel et al. 1996). Obwohl DXIs der Klasse I und II lediglich über eine Sequenzidentität von 20 bis 30 % zu einander verfügen, sind die Aminosäuren, die das aktive Zentrum formen, in beiden Klassen identisch (Park and Batt 2004). Zweiwertige Kationen wie Co^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} sind für die Aktivität und Thermostabilität beider Klassen essentiell (Callens, Kersters-Hilderson et al. 1988).

Heutzutage werden DXIs vorwiegend industriell bei der Herstellung von Maissirup/Glukose-Fruktose-Sirup (engl.: High Fructose Corn Syrup, HFCS) eingesetzt, da sie D-Glukose zu D-Fruktose umsetzen können und letztere eine höhere Süßkraft besitzt (Vieille, Epting et al. 2001). Ein weiteres Einsatzgebiet der DXIs ist die Herstellung von Bioethanol durch Fermentation aus Biomasse, vorwiegend aus Hemicellulose (Lönn, Träff-Bjerre et al. 2003). Abgesehen von der kommerziellen Nutzung ist die DXI aufgrund der ausgiebigen Untersuchungen ein ideales Modellenzym für Proteine mit zweiwertigen Kationen im aktiven Zentrum. In dieser Arbeit wurde die D-Xyloseisomerase aus dem Organismus *Streptomyces rubiginosus* verwendet.

3.5.2 Tertiäre Struktur der *Streptomyces rubiginosus* D-Xyloseisomerase

Bis heute sind eine Vielzahl an DXI-Strukturen unterschiedlicher Organismen und Klassen, wie z.B. *Streptomyces* (Carrell, Rubin et al. 1984), *Actinoplanes* (Allen, Lavie et al. 1994), *Arthrobacter* (Varsani, Cui et al. 1993), *Bacillus* (Rasmussen, Cour et al. 1994) und *Thermus* (Chang, Park et al. 1999), durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt worden. DXIs kommen vorwiegend als Homodimere und Homotetramere vor. Alle besitzen eine 45 – 50 kDa große Untereinheit mit nahezu identischem Aufbau. Ein Monomer besteht aus einer $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel-(TIM-Barrel)-Domäne, in der sich auch das katalytische Zentrum mit den beiden zweiwertigen Metallkationen befindet, und einer

C-terminalen helikalen Domäne. Diese Domäne interagiert mit der TIM-Barrel-Domäne des zweiten Monomers und formt so das Homodimer. Nicht weniger als 44 Wasserstoffbrückenbindungen halten die Monomere eng zusammen, dagegen sind es lediglich 14, die die beiden Dimere zu einem Tetramer verbinden (Whitlow, Howard et al. 1991).

Streptomyces rubiginosus D-Xyloseisomerase ist ein Tetramer mit dem oben beschriebenen strukturellen Aufbau (Abbildung 12). Das aktive Zentrum eines Monomers wird durch Reste der spiegelverkehrten Untereinheiten des zweiten Dimers innerhalb des Tetramers komplementiert, wobei Phe 26 des Nachbardimers in das aktive Zentrum hineinragt. Der Eingang der Bindetasche ist flankiert von hydrophoben Aminosäuren und bildet so eine amphiphatische Tasche (Carrell, Rubin et al. 1984). Über eine zweizählige Drehachse stehen die beiden Monomere und die tetramerbildenden Dimere sowohl strukturell als auch kristallographisch in Beziehung zueinander. Ein Tetramer besteht aus einem Dimer zweier Homodimere, die sich durch eine A-B/B*-A* Symmetrie kennzeichnen.

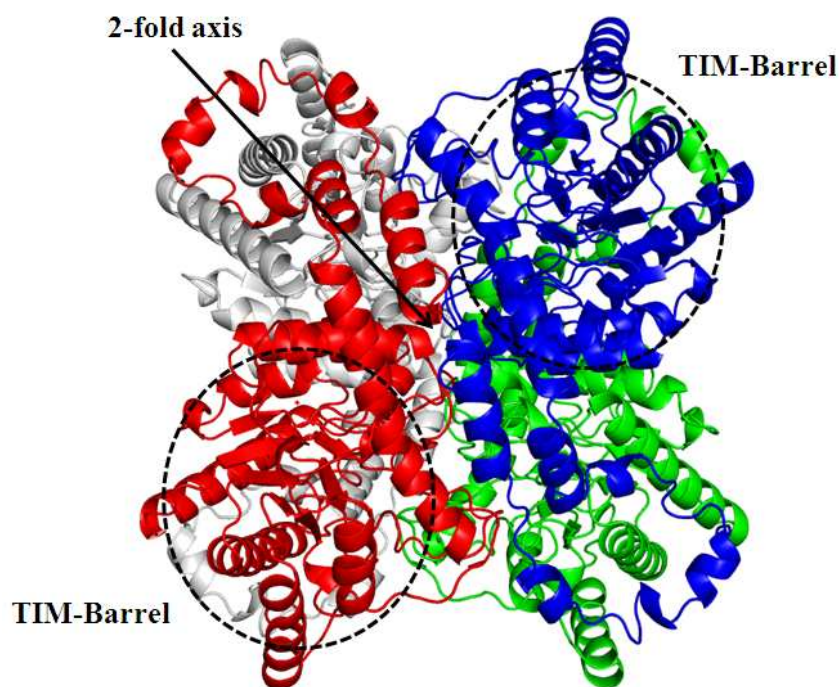


Abbildung 12: Darstellung der *Streptomyces rubiginosus* D-Xyloseisomerase als Cartoonmodell. Dargestellt ist das Tetramer mit seinem Bindungsmotiv; Grau: Monomer A – Rot: Monomer B – Grün: Monomer A* – Blau: Monomer B*. Im Zentrum des Tetramers befindet sich die Drehachse (2-fold axis) (PDB: 1XIC) (Carrell, Hoier et al. 1994).

3.5.3 Katalytischer Mechanismus der *Streptomyces rubiginosus* D-Xyloseisomerase

Der katalytische Mechanismus aller DXIs läuft nach einem Zweischnittverfahren ab. Zuerst wird der Zuckerring durch eine Säure-Base-Reaktion gespalten, bevor die lineare Form der α -D-Xylose zu α -D-Xylulose über einen so genannten „Hydrid-Shift“ isomerisiert werden kann. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, fungiert His 54 als Base und transferiert ein Proton zwischen der O1-Hydroxylgruppe und dem Ringsauerstoff. Asp 57 stabilisiert dabei die vorübergehende positive Ladung am His 54. Dieser Mechanismus, der zur Ringspaltung des cyclischen Zuckers führt, ist dem der Serinproteasen ähnlich (Abbildung 13) (Warshel, Naray-Szabo et al. 1989).

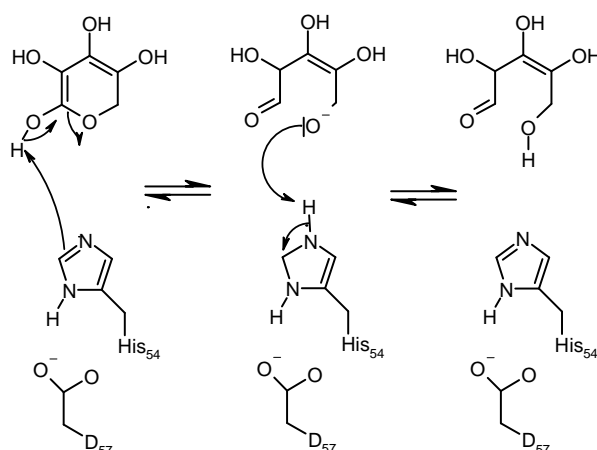


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Ringöffnungsreaktion in DXI

Die lineare Form der D-Xylose bindet dann über OH2 und OH4 des Zuckers an das erste Mn^{2+} . Ein Wassermolekül, das an das zweite Mn^{2+} koordiniert ist, und Lys 183 positionieren den linearen Zucker in eine O1-C1-C2-OH2 *cis*-Konformation. Die Isomerisierungsreaktion beinhaltet den Transfer von zwei Protonen (Abbildung 14). Die Wasserstoffatome von D-Xylose OH2 und C2 werden auf C=O1 und C1 der D-Xylulose übertragen. Die Isomerisierung wird durch ein Wassermolekül ausgelöst, welches auf der einen Seite zum Substrat OH2 und C=O1 und auf der anderen zum katalytischen Mn^{2+} und zu Asp 257 koordiniert ist. Dieses Wasser überträgt eines seiner

Protonen auf Asp 257 [A]. Das so entstandene Hydroxidion entzieht dem D-Xylose OH2 das Proton, worauf es negativ geladen ist [B]. Die negative Ladung und das Wasser werden durch das aktive Mn^{2+} stabilisiert, was dazu führt, dass das Wasser vorerst aus der Bindung zum Zucker verdrängt wird. Der nun stattfindende Transfer des D-Xylose C2-Wasserstoffs auf das in pro-R-Position befindende D-Xylulose C1 wird als 1,2-Hydrid-Shift bezeichnet [C]. Die negative Ladung am O2 wandert während dessen über das Zuckergerüst zum O1 [D]. Zum Schluss dient wiederum ein Wassermolekül als Proton-Donor. Es überträgt ein Proton auf das O1, um die D-Xylulose-Hydroxylgruppe in dieser Position zu bilden [E]. Vom Asp 257 wird nun das vorher aufgenommene Proton zurück auf Wasser übertragen [F]. Als letzter Schritt der Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose findet der Ringschluss in umgekehrter Form zur beschriebenen Ringspaltung statt (Whitlow, Howard et al. 1991).

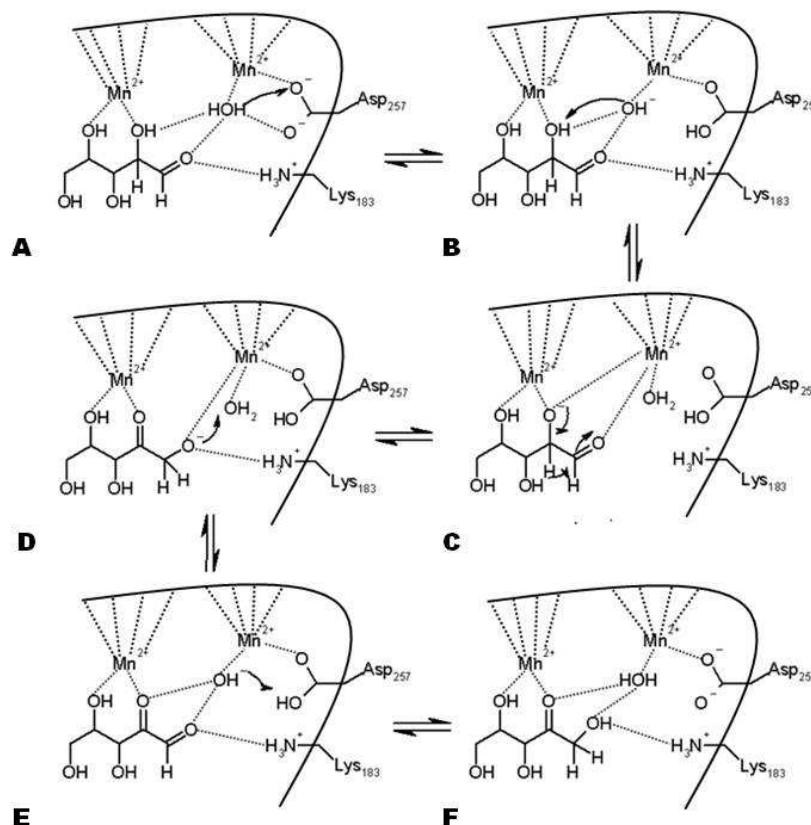


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose in DXI durch 1,2-Hydrid-Shift. A) Auslösen der Isomerisierung über das zentrale Wassermolekül durch Protonübertragung auf Asp 257. B) Entziehung des Protons vom D-Xylose OH2 durch das Hydroxidion. C) 1,2-Hydrid-Shift. D) Wanderung der negativen Ladung über das Zuckergerüst. E) Protonübertragung auf O1 der D-Xylose. F.) Regeneration des katalytischen Wassers.

3.6 Acetylcholinesterase

3.6.1 Einleitung

Acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) ist das Schlüsselenzym im zentralen Nervensystem. Es handelt sich um eine Hydrolase, die spezifisch die hydrolytische Spaltung von Acetylcholin zu Acetat und Cholin im synaptischen Spalt katalysiert (Abbildung 15) (Hasinoff 1982).

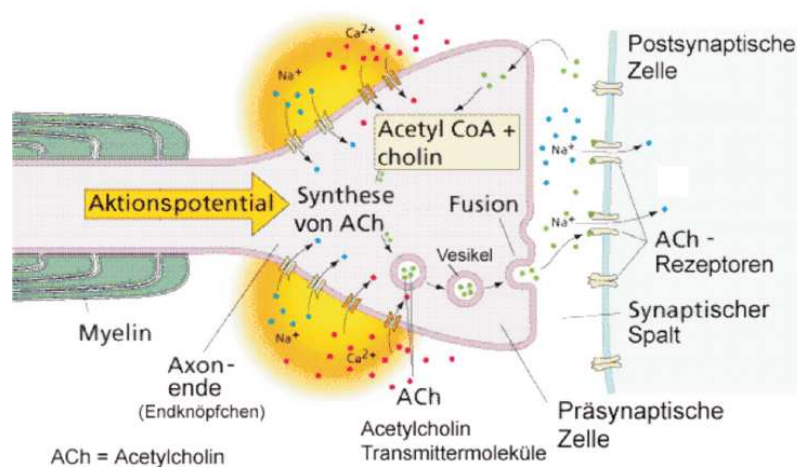


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Bindung einer cholinergen Synapse. Durch ein ankommendes Aktionspotential ausgelöst, wird der Neurotransmitter Acetylcholin in den synaptischen Spalt entlassen. Durch Bindung von Acetylcholin an den Acetylcholinrezeptor wird der Reiz weitergeleitet. Um eine Dauerreizung zu verhindern baut die AChE in wenigen Millisekunden den Neurotransmitter Acetylcholin im synaptischen Spalt wieder ab (Mueller 2002).

Im zentralen Nervensystem ist AChE an membranären Glykolipiden gebunden und kommt vorwiegend in der Nerven-Muskel-Synapse, in den autonomen Ganglien, dem Nebennierenmark, in den cholinergen Synapsen des Zentralnervensystems sowie in den elektrischen Organen von Zitteraalen und Rochen vor. Für eine Serinprotease ist AChE ein extrem schnelles Enzym. Ein Molekül AChE wandelt in der Sekunde 25000 Moleküle Acetylcholin um und ist dadurch entscheidend für die rechtzeitige Beendigung der durch Acetylcholin übertragenen Nervenimpulse (Nolte, Rosenberry et al. 1980). Durch die katalytische Fähigkeit der AChE wird somit die schnelle Reizweiterleitung der Nervenzellen ermöglicht.

AChE wird durch Indolalkaloide und Organophosphate gehemmt. Sie binden kovalent an das Enzym und führen somit zu einer permanenten Reizweiterleitung, da das Acetylcholin nicht mehr abgebaut wird, was letztendlich zum Tod durch Herzstillstand und Atemlähmung führt (Houghton, Ren et al. 2006). Aufgrund dieser Eigenschaft werden AChE-Inhibitoren als Insektizide in der Landwirtschaft (organische Phosphatverbindungen), aber auch als Nervengifte (Indolalkaloide) eingesetzt. Neben diesen isektizid-toxischen Verwendungen lassen sich AChE-Antagonisten aber auch als Medikamente gegen neurologische Störungen, wie z.B. Myasthenia Gravis oder die Alzheimer Krankheit, einsetzen (Nordberg 2006).

3.6.2 Tertiäre Struktur der *Torpedo californica* Acetylcholinesterase

Die Acetylcholinesterase bildet strukturell innerhalb der Serinproteasen eine eigene Familie. Sie gehört zu den α/β -Hydrolasen und besteht jeweils aus 12 β -Faltblättern und 14 α -Helices. Bei der AChE handelt es sich um ein Tetramer, das aus 2 Homodimeren gebildet wird (Taylor and Radic 1994). Die erste 3D-Struktur einer Acetylcholinesterase war 1991 die des Fisches *Torpedo californica* (Sussman, Harel et al. 1991). Bis heute sind eine Reihe weiterer AChE-Proteinstrukturen bekannt, nämlich von Maus: *Mus-musculus*-AChE (Bourne, Taylor et al. 1995), Zitteraal: *Electrophorus-electricus*-AChE (Bourne, Grassi et al. 1999), Fruchtfliege: *Drosophila-melanogaster*-AChE (Harel, Kryger et al. 2000) und Mensch: *humane*-AChE (Kryger, Harel et al. 2000).

Abbildung 16 zeigt die Monomerstruktur der AChE aus *Torpedo californica*. Ein Monomer dieser AChE besitzt 537 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 68 kDa. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, liegt das aktive Zentrum in einer 20 Å tiefen Schlucht (*active site gorge*) in der Mitte des Enzyms wobei der Eintrittskanal unerwarteter Weise von einer Vielzahl an hydrophoben Aminosäuren flankiert wird (Sussman, Harel et al. 1993). Für den katalytischen Mechanismus sind zwei Subtaschen verantwortlich. Zu einem wäre da die Estertasche mit der katalytischen Triade, bestehend aus Ser 200, His 440 und Glu 327 und auf der anderen die anionische Tasche mit dem Glu 199 zu nennen. Unerwarteterweise ist die anionische Tasche eher hydrophob und ungeladen, obwohl sie den positiv geladenen Teil des Acetylcholinmoleküls bindet. Abgesehen von diesen zwei Subtaschen existieren noch

weitere Bindetaschen, in denen Liganden binden und somit die Inhibierung dieses Enzyms ermöglichen (Taylor and Lappi 1975).

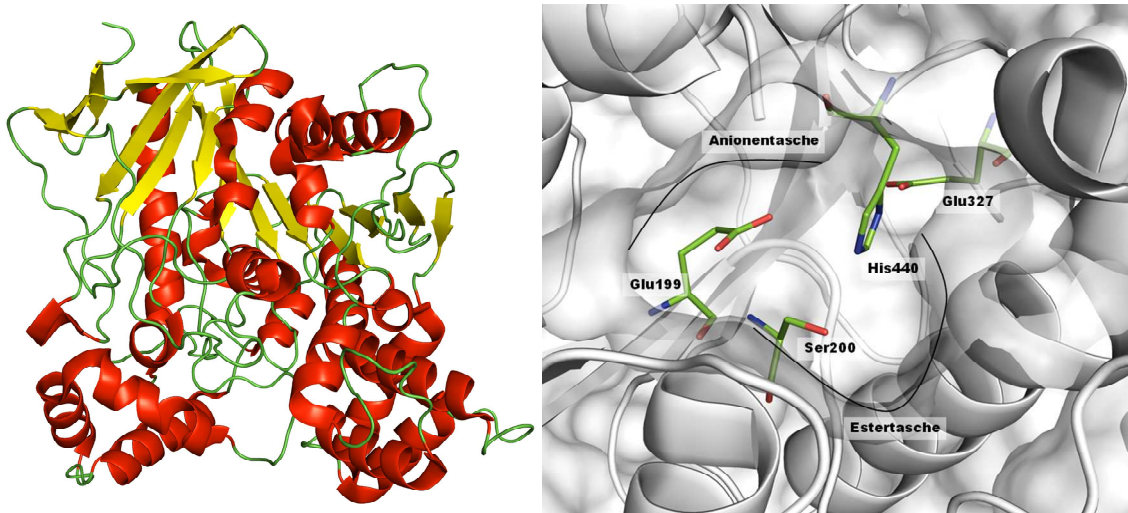


Abbildung 16: Tertiärstruktur von TcAChE (links) und seinem aktiven Zentrum (rechts). Links zeigt die Tertiärstruktur des TcAChE-Monomers, dargestellt als Cartoonmodell (α -Helices rot; β -Faltblätter gelb und Schleifen grün). Rechts ist das aktive Zentrum mit den katalytisch wichtigen Untertaschen Anionen- und Estertasche zu sehen. Die Bindetasche befindet sich tief vergraben im Proteininneren. Die Aminosäuren sind grün im „stick“-Modus repräsentiert, wobei Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot dargestellt sind (PDB Code: 1ACJ) (Sussman, Harel et al. 1993)

3.6.3 Katalytische Mechanismus der Acetylcholinesterase

Das Enzym AChE wirkt wie ein „Staubsauger“ auf die im synaptischen Spalt frei diffundierenden Acetylcholin-Moleküle. Das positiv geladene Acetylcholin (ACh) wird über permanente Dipol-Wechselwirkungen durch die „active site gorge“ dem aktiven Zentrum zugeführt und dort zu Acetat und Cholin hydrolysiert (Ripoll, Faerman et al. 1993).

Die katalytische Aktivität des Enzyms beruht auf Ser 200, das zusammen mit Glu 327 und His 440 die katalytische Triade und somit die zentrale Einheit des aktiven Zentrums bildet. Diese Triade ist ähnlich zu denen der Serinproteasen, doch anstelle von Glu 327 befindet sich in Serinproteasen ein Aspartat (Stroud 1974). Gelangt nun ein Acetylcholinmolekül in die Nähe der katalytischen Triade, stabilisiert von Glu 327 den Ring des His 440 so, dass dieses das Proton der Hydroxylgruppe von Ser 200 übernehmen kann, welches dadurch nukleophil aktiviert wird [A] (Abbildung 17). Das deprotonierte Ser 200 führt dann einen nukleophilen Angriff auf den

Carbonylkohlenstoff des Acetylcholins durch, wodurch ein tetraedischer Übergangszustand entsteht. Anschließend kommt es zu einem Protonentransfer von His 440 auf Cholin, worauf der Übergangszustand in einen Acetyl-Protein-Komplex und ein Cholin-Molekül zerfällt [B]. Von einem in der Bindetasche lokalisierten Wasser wird ein Proton nun wieder auf das His 440 übertragen [C]. Das verbleibende Hydroxidion greift nun den Acetyl-Protein-Komplex an und spaltet Essig-Säure ab [D]. Die katalytische Triade wird wieder in den Ausgangszustand versetzt, indem Ser 200 das benachbarte His 440 wieder deprotoniert [E].

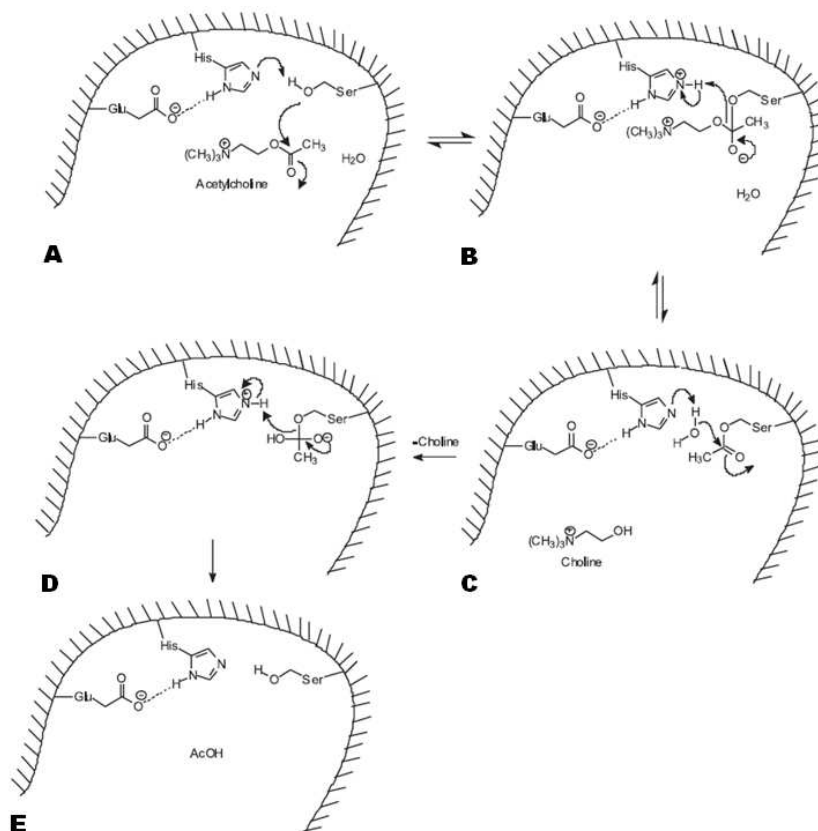


Abbildung 17: Schematische Darstellung der hydrolytischen Spaltung von Acetylcholin zu Cholin und Essigsäure durch das Enzym AChE (Delfino, Ribeiro et al. 2009). A) Bindung des Ach-Moleküls und nukleophile Aktivierung des Ser 200. B) Nukleophiler Angriff des Ser 200 auf die C=O Gruppe des Ach. Protonentransfer von His 440 auf Ach. Zerfall des Ach-Moleküls. C) Verlassen der Bindetasche des Cholinmoleküls und Protonübertragung von einem Wassermolekül auf His 440. D) Angriff des Hydroxidions auf den Acetyl-Protein-Komplex. Abspaltung der Essigsäure. E) Regeneration der katalytischen Triade durch Deprotonierung.

3.7 Endothiapepsin

3.7.1 Einleitung

Endothiapepsin (EC 3.4.23.6) gehört zu den pepsinähnlichen Aspartatproteasen der Familie A1 und kommt hauptsächlich in Pilzen vor. In der Natur sind Aspartatproteasen universell verbreitet und an vielen biomedizinischen Prozessen beteiligt (Davies 1990). Als bekannte Beispiele für Aspartatproteasen in der Arzneimitteltherapie lassen sich Renin, welches bei der Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) in der Blutdrucktherapie eine wichtige Rolle spielt, und die HIV-Proteasen zur Hemmung der Replikation der HI-Viren in der AIDS-Therapie nennen (Wood, Schnell et al. 2005; Blum, Böttcher et al. 2008; Böttcher, Blum et al. 2008).

Bei Aspartat-Proteasen der Familie A1 handelt es sich um proteolytische Enzyme mit homologer Sequenz. In der Regel verfügen sie über 323 bis 340 Aminosäuren (Blundell, Jenkins et al. 1990).

Endothiapepsin selbst gilt nicht als Ziel in der Arzneimitteltherapie, wird aber als Modellenzym zur Entwicklung neuer Leitstrukturen für pepsinähnliche Aspartatproteasen herangezogen.

3.7.2 Tertiäre Struktur von Endothiapepsin

Endothiapepsin ist ein bilobales Enzym bestehend aus 330 Aminosäuren, die 20 β -Faltblättern und 5 kleinen α -Helices aufbauen und ein zweilappiges topologisch äquivalentes Pseudodimer bilden. Letzteres besteht aus zwei β -Domänen, von denen lediglich 13 Aminosäuren untereinander identisch sind, jedoch befinden sich 86 Reste topologisch an vergleichbare Stelle (Abbildung 18). Das aktive Zentrum liegt zwischen den beiden Domänen in einer tiefen Kluft. Die katalytischen Aspartatreste Asp 35 und Asp 219 werden jeweils von einer Domäne gestellt. Sie sind jeweils auf der Spitze einer konservierten Schleife der jeweiligen Domäne lokalisiert. Über Wasserstoffbrückenbindung werden sie räumlich eng beieinander gehalten. Dieses Wasserstoffbrückennetzwerk wird durch die sich in Nachbarschaft zu den beiden Aspartatresten befindlichen Aminosäuren Asp-Thr-Gly-Ser/Thr gebildet, was dazu führt, dass sich die katalytischen Aspartate in einer planaren Anordnung mit einem

Abstand von 2,9 Å zueinander befinden (Pearl and Blundell 1984). Zudem wird die konservierte Bindetasche durch eine N-terminale Haarnadelschleife (*flap*) gegenüber dem Solvens abgeschirmt. Alle pepsinartigen Aspartatproteasen zeigen diesen ähnlichen Aufbau, was vermuten lässt, dass sich die Struktur aus einer Gen-Duplikation entwickelt hat (Tang, James et al. 1978).

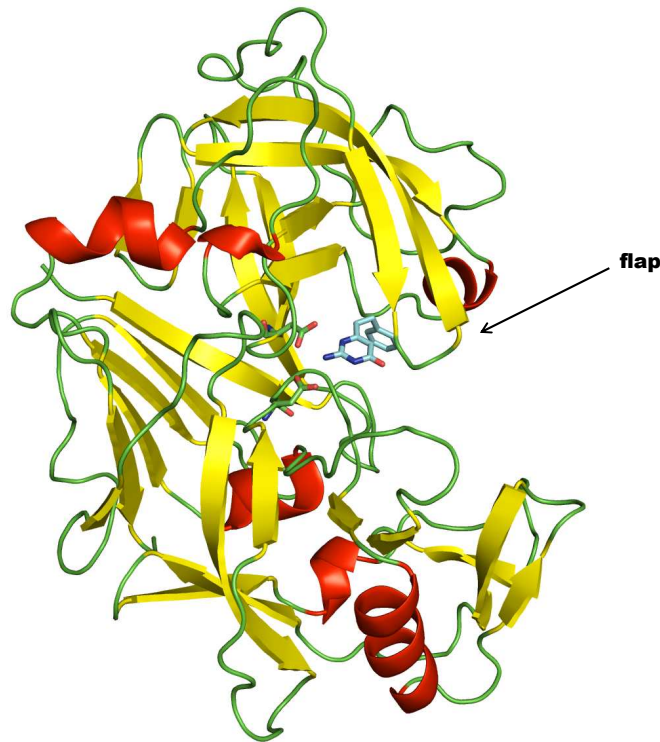


Abbildung 18: Tertiärstruktur von Endothiapepsin als Cartoonmodell (α -Helices rot; β -Faltblätter gelb und Schleifen grün) mit dem Liganden V15 (2-Amino-6-(2-phenylethyl)-pyrimidin-4(3H))-one in der Bindetasche; PDB-Code 1V00 (Geschwindner, Olsson et al. 2007). Der Ligand (hellblau) und die katalytisch aktiven Aspartatreste sind im „stick“-Modus repräsentiert, wobei Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot dargestellt sind.

3.7.3 Katalytischer Mechanismus der Aspartatproteasen

Alle Aspartat-Proteasen binden Substrate und Inhibitoren auf dieselbe Art und Weise und verfügen über den gleichen proteolytischen Mechanismus (Abbildung 19). Die Spaltung der Peptidbindung des Substrates ist sowohl vom pH-Wert als auch vom Ionisierungszustand der zwei katalytischen Aspartatreste abhängig (Suguna, Padlan et al. 1987). Zu Beginn der Enzym-Reaktion liegt ein Aspartat deprotoniert, das andere jedoch protoniert vor. Durch die Wechselwirkung mit dem Carboxylat-Anion wird ein

Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom des Substrates aktiviert. Die Elektrophilie dieses Kohlenstoffatoms wird durch eine H-Brücke zu dem benachbarten Aspartat erhöht. Das zweite Aspartat fixiert und polarisiert das Wassermolekül im Raum [A]. Das entstehende tetraedische Intermediat besitzt am zentralen Kohlenstoff vorrübergehend zwei Hydroxygruppen, die von den Aspartatresten über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden [B]. Anschließend erfolgt die Spaltung der peptidischen C-N-Bindung und das Substrat zerfällt in die entsprechende Carbonsäure und das Amin [C].

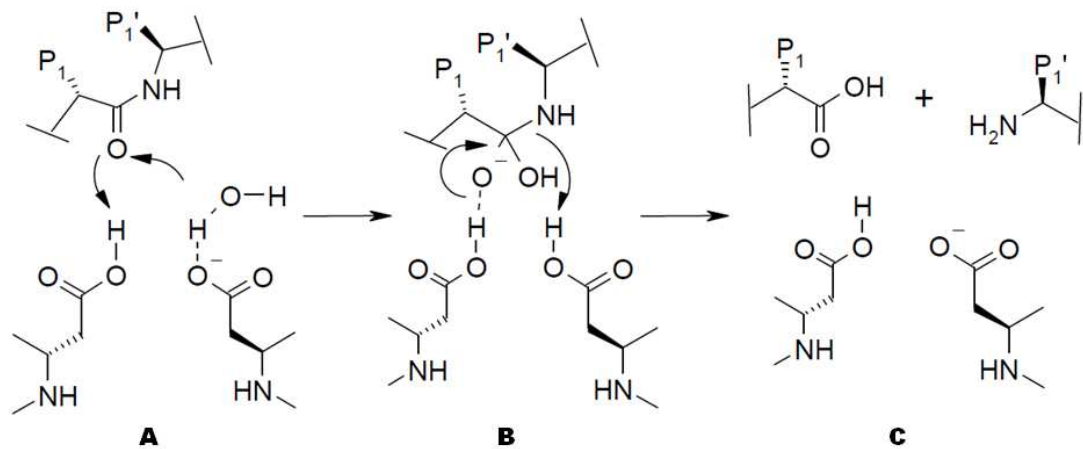


Abbildung 19: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der Aspartatproteasen. A) Nukleophile Aktivierung eines Wassermoleküls durch Wechselwirkung mit dem Carboxylat-Anion. B) Entstehung des tetraedischen Intermediats. C) Spaltung der peptidischen C-N-Bindung mit Zerfall des Substrates in die entsprechende Carbonsäure und das Amin. Quelle: (Blum 2007).

3.8 Sekretorische Aspartatprotease 2

3.8.1 Einleitung

Die sekretorische Aspartatprotease 2 (Sap2) ist eines von 10 Isoenzymen des Hefepilzes *Candida albicans*. Die Sap2, das am häufigsten vorkommende Isoenzym, wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als preSAP translatiert und anschließend durch die Kex2-Protease hydrolytisch im Golgi-Apparat aktiviert (White, Miyasaki et al. 1993). Der *C. albicans* Pilz kommt als harmloser Begleiter bei 50 % der Bevölkerung im Gastrointestinaltrakt und auf diversen Schleimhäuten vor (White and Agabian 1995). Jedoch kann er durch diesen opportunistischen Organismus bei Schwächung des Immunsystems, z. B. bei AIDS- oder Krebspatienten bzw. bei prädisponierenden Faktoren wie langen Antibiotikabehandlungen oder Diabetes mellitus, von oberflächlichen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen kommen (Pichová, Pavlíková et al. 2001). Neben den Schleimhäuten werden vor allem die inneren Organe und das zentrale Nervensystem befallen. Im fortgeschrittenen Stadium können systemische *Candida*-Mykosen aufgrund von Resistenzen gegenüber gebräuchlichen Arzneimitteln sogar bis hin zum Tod führen (Koelsch, Tang et al. 2000). Obwohl die Virulenzfaktoren des *C. albicans* abhängig von der Art der Infektion sind, gelten die zehn sekretorischen Aspartatproteasen (Sap1-10) als Schlüsselfaktoren. Vermutlich sind sie gerade bei den ersten Schritten der Infektion beteiligt, die durch Epitheladhäsion und Epithelpenetration aufgrund der Hydrolyse von Oberflächenproteinen hervorgerufen wird (Monod, Hube et al. 1998).

Beobachtungen bei HIV-Patienten haben gezeigt, dass sie, wenn sie mit Aspartatproteaseinhibitoren behandelt wurden, weniger anfällig für *C. albicans*-Infektionen waren (Gruber, Speth et al. 1999). Allerdings wird vermutet, dass nicht nur die Sap2 allein, sondern auch weitere Isoenzyme für das Fortschreiten der Infektion verantwortlich sind. Dementsprechend sollten Sap2-Inhibitoren auch andere Enzyme der Sap-Familie hemmen, um effektiv gegen den Pilz zu wirken (Staib, Lermann et al. 2008).

3.8.2 Tertiäre Struktur der Sekretorischen Aspartatprotease 2

Die dreidimensionale Struktur der *C. albicans* Sap2 wurde zuerst 1996 bestimmt (Abad-Zapatero, Goldman et al. 1996) und entspricht dem klassischen Aufbau der Aspartatproteasen der Pepsin-Familie (siehe Kapitel 1.2.7.2). Die Sap2 besitzt 342 Aminosäuren, und im Gegensatz zu Endothiapepsin (Kapitel 1.2.7) sind hier Asp 32 und Asp 218 die katalytisch aktiven Aspartatreste. Wie alle Sap-Isoenzyme besitzt auch die Sap2 eine vergrößerte S3-Bindetasche, die auch von einer zweiten Schleife (*flap2*) überlagert wird (Abbildung 20). Einzigartig bei den Sap-Enzymen ist auch, dass sie an der Spitze der N-terminalen Haarnadelschleife einen Asp 86-Rest tragen. Es wird angenommen, dass genau diese Modifikation zur breiten Substratspezifität führt, die z.B. viele humane Enzyme wie Mucin, extrazelluläre Matrixenzyme, Proteine des Immunsystems, endotheliale Zellproteine und Gerinnungsfaktoren betreffen (Naglik, Challacombe et al. 2003). Der Katalysemechanismus der Sap2 gleicht dem aller Aspartatproteasen und läuft analog, wie im Detail im Kapitel 3.7.3 beschrieben, ab.

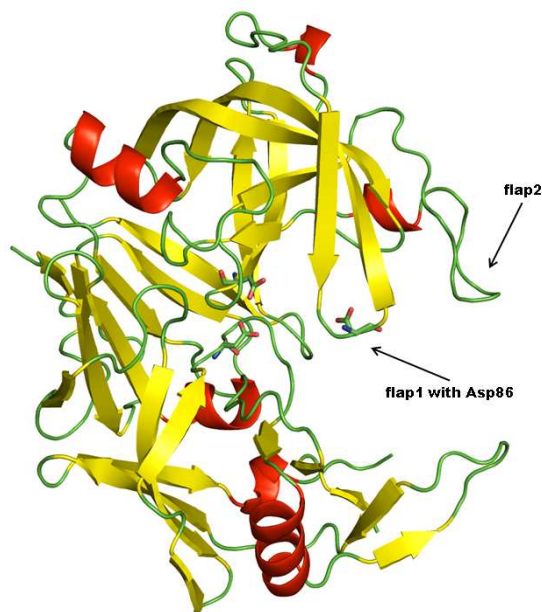


Abbildung 20: Tertiärstruktur der Sekretorischen Aspartatprotease 2 als Cartoonmodell (α -Helices rot; β -Faltblätter gelb und Schleifen grün). PDB Code 1ZAP (Abad-Zapatero, Goldman et al. 1996)

4 Use of xenon/protein complexes as a generic tool for SAD phasing of in house data

Bei dem folgenden Text handelt es sich um ein Manuskript, welches zur Veröffentlichung in einer wissenschaftlichen Zeitschrift vorgesehen ist. Es beschreibt zusammenfassend den positiven Verlauf der Verwendung von Xenon als Schweratomderivat in der 3D-Strukturbestimmung von Proteinen durch die SAD-Methode mit *in house* gesammelten Daten. Die Formatierungen wurden dem Format der vorliegenden Arbeit angepasst. Da die international übliche naturwissenschaftliche Sprache Englisch ist, wurde das Manuskript in dieser Sprache verfasst.

4.1 Introduction

Early experimental and theoretical studies of the interactions of xenon with proteins were performed by Lawrence and colleagues (Lawrence, Loomis et al. 1946). In 1965, Schoenborn and colleagues were able to locate a xenon atom in sperm whale myoglobin by collecting a room temperature dataset using a CuK α rotating anode (Schoenborn, Watson et al. 1965). Two years later, utilization of xenon as a heavy atom in protein structure determination was proposed (Schoenborn, Featherstone et al. 1967). Following the pioneering work of Schoenborn and colleagues, further studies of xenon-protein complexes were performed by Tilton and co-workers (Tilton, Kuntz et al. 1984; Tilton 1988), and in 1991 an interpretable electron density map was obtained from a single xenon derivative using SIRAS phasing with *in-house* data (Vitali, Robbins et al. 1991). Based on these results, the use of xenon as a heavy atom derivative in protein X-ray crystallography was generalized by Schiltz and co-workers (Schiltz, Prange et al. 1994). Subsequently, xenon complexes were used several times for structure determination (Stowell, Soltis et al. 1996; Quillin, Breyer et al. 2000; Cohen, Ellis et al. 2001), but never for SAD phasing with *in-house* data.

Even though the studies with xenon described above revealed its potential, the use of noble gases in macromolecular X-ray phase determination is still somewhat exotic, and the methodology is utilized only when other methods have failed, *e.g.* the ne plus ultra,

MAD phasing with selenomethionine (Hendrickson, Horton et al. 1990). Nevertheless, the anomalous signal for xenon at CuK α wavelength ($f'' = 7.717$) is significant (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/cryst/anom.html>).

Xenon derivatization provides the opportunity to conduct SAD experiments and to obtain phases, as in the present study on a home source, using only a single crystal, provided one has access to a xenon chamber, either a home built one (Soltis, Stowell et al. 1997), or a commercially available one, such as the Hampton apparatus (Machius, Henry et al. 1999). Due to the fact that xenon interacts with proteins only via non-covalent, weak van der Waals forces (Tilton 1988), it does not induce any major changes in protein structure; consequently, crystals of xenon complexes are highly isomorphous with the native protein structure (Schiltz, Fourme et al. 1995).

At first sight, no typical or specific binding sites for xenon can be assigned. However, it has been predicted that there is, on the average, a ~50 % likelihood that a native protein will contain a binding cavity able to accommodate it (Stowell, Soltis et al. 1996). Xenon thus appears to be a most suitable probe for determining SAD phases, especially on a single wavelength home source that does not permit MAD experiments. Furthermore, xenon SAD phasing is also an attractive alternative for proteins that do not contain sufficient methionine residues for Se-Met derivatization, or for which high-throughput phasing is desirable.

Thermolysin (TLN) (Holmes and Matthews 1982) and endothiapepsin (EP) (Cooper, Foundling et al. 1987) were selected as the initial target proteins since both enzymes are considered as prototypic model targets for zinc and aspartic proteases, respectively, and have, therefore, been extensively studied. Furthermore, both are commercially available, easy to crystallize, and produce high quality diffraction patterns. TLN is a 316-residue bacterial zinc endopeptidase, with one half being mainly α -helical, and the other half mainly composed of β -sheets. The fungal aspartic proteinase, EP, is a 330-residue bilobal molecule, containing 20 β strands and 4 small α helices, arranged in two topologically equivalent lobes which are related by an approximate 2-fold axis.

As an additional third target, the glycosylphosphatidylinositol-anchored homo-dimer of *Torpedo californica* acetylcholinesterase (*TcAChE*) (Sussman, Harel et al. 1991), is a

glycoprotein that contains 537 amino acids in each monomer, which consists of a 12-strand mixed β -sheet surrounded by 14 α -helices.

4.2 Methods

4.2.1 Crystallization

Native TLN was purchased from Calbiochem[®] (Merck Bioscience GmbH, Schwalbach, Germany), and was crystallized as described by Holmes and Matthews (Holmes and Matthews 1982), with the following slight modifications. TLN was predissolved in 100 % DMSO and then mixed 1:1 in 3.26 M CsCl/0.10 M Tris/HCl (pH 7.5) to a final TLN concentration of 4.0 mM. Crystals were grown using the sitting-drop vapor diffusion method, with water as the reservoir solution.

EP was purchased as Suparen 600[®] from DSM Food Specialties (DSM Food Specialties, AX Delft, Netherlands). Before crystallization, buffer exchange was required. EP was dialyzed using a Vivaspin 10000 concentrator against 100 mM sodium acetate, pH 4.5.

Native crystals of EP were obtained as described (Geschwindner, Olsson et al. 2007), with the following slight modifications. Native EP crystals were grown using the sitting drop/vapour diffusion method, with drops containing 2 μ l of protein solution (5 mg/ml) and 2 μ l of reservoir solution (1 ml), consisted of 25 % PEG 4000/200 mM ammonium acetate/100 mM sodium acetate, pH 4.5.

TcAChE was solubilized and purified as described previously (Sussman, Harel et al. 1988). Crystallization was achieved by the vapor diffusion method (Sussman, Harel et al. 1988), at 4 °C, using hanging drops containing 10 mg/ml protein in 42% PEG 200/150 mM MES, pH 6.5. Due to the cryoprotective capacity of PEG 200, no additional cryoprotectant was necessary, and crystals were directly loop-mounted and flash-cooled in liquid nitrogen prior to data collection.

4.2.2 Xenon derivatization

Crystals of TLN and EP were mounted on a Hampton CrystalCap HT™, and dipped in a drop of cryoprotectant which consisted of 25 % glycerol in mother liquor. *TcAChE* crystals were mounted similarly, but without any additional cryoprotectant. A small amount of mother liquor was added to the pressure cell to prevent the crystals from drying out.

To obtain xenon complexes of EP and *TcAChE*, their crystals were pressurized at a pressure of 300 PSI for 7 min (EP) and 2 min (*TcAChE*), using a xenon chamber constructed *in-house* (Figure 21), which is close in design to the SSRL Xenon Pressure Cell (Soltis, Stowell et al. 1997). After pressure had been released, the crystals were immediately flash frozen in liquid nitrogen. For crystals of *TcAChE* it was not possible to pressurize for longer than 2 min due to the occurrence of dehydration, which also resulted in high mosaicity during data collection.

Xenon derivatives of TLN were prepared using the Hampton Xenon Chamber (Machius, Henry et al. 1999) in the Israel Structural Proteomics Center (ISPC), at the Weizmann Institute of Science, at a pressure of 300 PSI for 10 min.

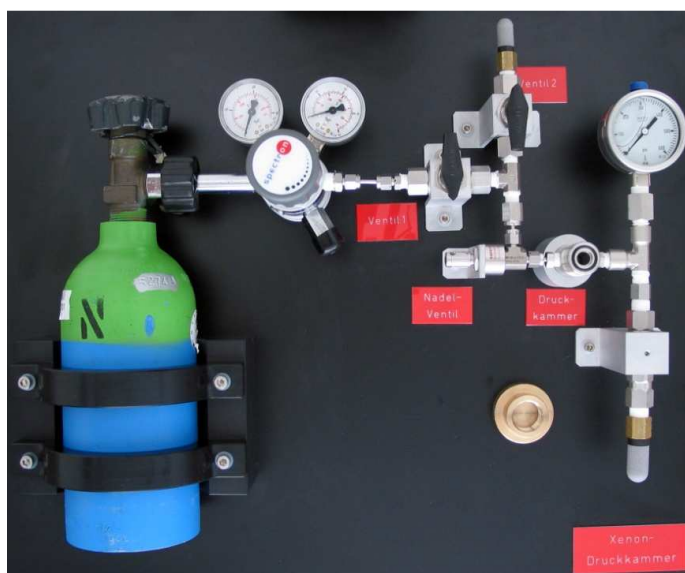


Figure 21: *Xenon-Chamber, according to SSRL Xenon Pressure Cell*

4.2.3 Data collection and processing

Data for TLN, EP and *TcAChE* were collected at 100 K. The TLN data set was collected on a RIGAKU RU-H3R copper rotating anode at 1.5418 Å, 50 kV and 90 mA, using an R-AXIS IV⁺⁺ image plate system. The data sets for EP and *TcAChE* were collected on an Incoatec, I μ S copper microfocus source, using a MAR345 DTB image plate detector system.

For each frame, the exposure time and oscillation rate were set to 7 min and $\Delta\phi = 0.5^\circ$, respectively. The crystal-to-detector distance was 150 mm. To ensure high accuracy of the measured intensities, the data were collected with high redundancy. Processing and scaling of TLN and EP datasets were performed using the HKL2000 package (version 1.98.7) (Otwinowski and Minor 1997). The *TcAChE* dataset was processed and scaled with XDS (version 2009) (Kabsch 1993). Details of data collection are listed in Table 1.

<i>Dataset</i>	<i>TLN^a</i>	<i>EP^a</i>	<i>TcAChE^b</i>
Wavelength [Å]	1.5418	1.5418	1.5418
Spacegroup	P6 ₁ 22	P21	P3121
Unit cell parameters [Å, °]	a, b = 93.1 c = 130.2	a = 45.7 b = 73.5 c = 53.3 $\beta = 109.9$	a,b = 111.8 c = 137.2
<i>I</i> / σ (<i>I</i>) ^c	35.2 (6.7)	24.7 (6.3)	21.0 (4.2)
Resolution [Å] ^c	24.85 – 1.98 (2.02 – 1.98)	25.00 – 1.79 (1.82 – 1.79)	20.0 – 2.34 (2.39 – 2.34)
Completeness (%) ^c	99.7 (98.6)	98.9 (78.4)	99.4 (90.9)
Redundancy ^c	24.1 (19.3)	7.2 (6.0)	14.0 (11.3)
Mosaicity	0.7	0.7	1.0
No. of unique reflections	23786	30398	41886
R _{sym} (%) ^{c,d}	10.4 (46.6)	8.7 (23.7)	9.4 (40.4)
Matthews coeff. [Å ³ /Da]	2.4	2.5	4.0
Solvent content [%]	48.1	47.0	70.7
PDB code	3LS7	3LZY	3M3D

^aValues for data processed with HKL2000; ^bValues for data processed with XDS; ^cValues in brackets refer to the highest resolution shell; ^d $R_{\text{sym}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \bar{I}(\text{hkl})| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$.

Table 1: Data sets collected

4.2.4 Phase determination

Structure determination, in all cases, utilized the graphical interface of hkl2map (version 0.2) (Pape and Schneider 2004), which connects several programs from the Shelx-suite (Sheldrick 2008) to guide the user from analysis of scaled diffraction data (ShelxC), via substructure solution (ShelxD), to phasing (ShelxE). In addition to conventional ShelxE, we were able to use the new beta-test version (kindly provided by Prof. George Sheldrick), which includes auto-tracing of the protein backbone via a polyalanine model (Sheldrick, 2010).

AutoSHARP/SHARP (version 3.4.0) (de La Fortelle and Bricogne 1997; Vonrhein, Blanc et al. 2007) was also used for phasing. In all cases in which autoSHARP/SHARP was utilized, the xenon refinement and phase calculation were carried out with the standard protocols implemented in AutoSHARP, in which ShelxC and ShelxD are also used for substructure determination. Thereafter, the quality of the electron density maps obtained was improved using solvent flipping and protein truncation, which was performed by use of the program SOLOMON (Abrahams and Leslie 1996) and density modification using the program DM (Cowtan and Zhang 1999). Both these programs are implemented as standard procedures in the AutoSHARP interface.

Nevertheless, after obtaining initial phases of TLN, EP and *TcAChE* with the programs hkl2map and SHARP, an additional density modification step was performed using DM (version 6.0), as implemented in the ccp4i (Collaborative Computational Project Number 1994) interface, before starting the model building program ARP/wARP (Perrakis, Morris et al. 1999), which is also implemented in ccp4i. The phasing statistics are summarized in Table 2.

<i>Dataset</i>	<i>TLN</i>	<i>EP</i>	<i>TcAChE</i>
Resolution range (Å)	24.9 – 1.98	50.1 – 1.81	19.8 – 2.34
d ² /sig(d ²) (ShelxC) max/min	2.87 – 0.68	2.60 – 0.95	1.58 – 0.78
Resolution cut off (ShelxD) (Å)	2.5	2.3	3.3
CCmax (ShelxD)	49.1	22.5	22.3
Number of xenon sites (refined occ.)	1 (0.81)	1 (0.55)	2 (0.38/0.56)
CC (ShelxE_beta)	43.9	38.7	30.2

Contrast (ShelxE_beta)	56.3	65.2	69.1
Mean FOM (Shelx_beta)	0.525	0.632	0.622
Residues (ShelxE_beta) / orig.	308/316	319/330	494/537

^aanomalous phasing power $[(|\Delta F^2_{PH}(obs)| - |\Delta F^2_{PH}(calc)|)^2]^{1/2}$

Table 2: phasing statistics

4.2.5 Model building and refinement

In all cases, the initial phases achieved with hkl2map and AutoSHARP/SHARP, followed by further density modification, were submitted to the automatic model-building program, ARP/wARP (version 7.0.1). The xenon complexes of TLN and TcAChE were thus easily built on the basis of both their hkl2map and SHARP electron density maps. In the case of TLN, already after 50 building cycles, 312 out of 316 residues in 4 chains were found, with a connectivity index of 0.98. For TcAChE, within 50 building cycles 512 out of 537 residues in 6 chains were found, with a connectivity index of 0.96.

The model building of the xenon complex of EP turned out to be more challenging. After an initial 200 building cycles, only 135 residues out of 330 in 19 chains were found. However, starting a further ARP/wARP run, based on the model obtained in the previous run, a further 200 building cycles yielded 322 residues out of 330 in 5 chains, with a connectivity index of 0.97.

With the new beta-testing version of ShelxE, rapid backbone tracing was achieved in all cases. Here, by 10 cycles of 400 density modification steps, 308 out of 316 residues were found for TLN, 319 out of 330 for EP, and 494 out of 537 for TcAChE. Subsequently, the polyalanine models of each protein were used in ARP/wARP as a starting model for side-chain building and further model improvement. After ARP/wARP, the models contained 303 out of 316 residues for TLN, 322 out of 330 residues for EP, and 507 out of 537 residues for TcAChE.

All resulting models of TLN, EP and TcAChE were refined with Shelxl (version 97-3) (Sheldrick, Schneider et al. 1997) to final R-factors of 16.5 % for TLN, 16.7 % for EP, and 17.7 % for TcAChE (for refinement statistics see Table 3). Thr 26 of TLN lies in a

forbidden region of the Ramachandran plot, but this is frequently observed for residues located at the tip of a γ -like turn (Matthews 1972). In the case of *TcAChE*, Ser 200 lies in forbidden regions of the Ramachandran plot. For Ser 200, which is the active-site nucleophile, good electron density is observed. As is the case for other members of the α/β -hydrolase fold family, it is the central residue in a sharp γ -like turn, like Thr 26 in TLN, and is known to lie in a forbidden region (Ollis, Cheah et al. 1992).

<i>Dataset</i>	<i>TLN</i>	<i>EP</i>	<i>TcAChE</i>
Program used for refinement	Shelxl	Shelxl	Shelxl
Resolution range	10 – 1.98	10 – 1.79	10 – 2.34
Reflections used in refinement	21686	30201	41745
Final R values			
Rfree (Fo; Fo>4 σ)	24.4; 23.6	20.5; 21.1	23.3; 25.4
Rwork (Fo; Fo>4 σ)	17.6; 17.0	16.1; 15.5	17.9; 20.8
No of protein atoms (non-hydrogen)	2434	2373	4200
Water molecules	213	259	210
Ions and other atoms (non-hydrogen)	62	19	88
Ramachandran plot most favoured regions (%)	85.9	94.2	90.1
Additional allowed regions (%)	13.7	5.8	9.3
Generously allowed regions (%)	0.4	0	0.4
Disallowed regions (%)	0.4	0	0.2
Mean B-factors (\AA^2)			
Protein atoms	22.0	15.7	42.9
Protein main chain	20.0	16.7	41.1
Protein side chain	24.2	19.1	44.8
Xe atom	22.1	17.4	54.1
Ions and other atoms	33.9	26.1	49.4
Water molecules	30.4	27.5	47.4
RMSD bond lengths [\AA]	0.008	0.008	0.007
RMSD bond angles [$^\circ$]	1.9	2.0	1.8

Table 3: Refinement statistics

4.3 Results and discussion

Crystals of TLN, EP and *TcAChE* were all pressurized with xenon gas at a pressure of 300 PSI for 2–10 min. After depressurization, within <15 s the crystals were flash frozen, in liquid nitrogen, and mounted on the diffractometer under a stream of cold nitrogen at 100 K. This is the most crucial step in xenon derivatization. Once the crystals have been successfully flash frozen, directly after release of the xenon pressure, they are stable for at least a month in liquid nitrogen without losing any detectable xenon occupancy.

Due to the good quality of the resulting density maps after phasing with hkl2map or with SHARP, the model building for both TLN and *TcAChE* with ARP/wARP was straightforward. Using either program, 313 of 316 residues of TLN were already built after 50 building cycles, with a connectivity index of 0.98. Only Ile at the C-terminus, one Val and two Pro residues were missing, but were easily built manually during refinement. For *TcAChE*, 512 of 537 residues were already built by ARP/wARP after 50 building cycles, with a connectivity index of 0.96. Only the N-terminal and the two C-terminal residues could not be assigned during refinement, but this seems to be typical of the *TcAChE* structures deposited in the PDB.

Due to the suboptimal phasing results for EP, successful model building required additional density improvement by use of DM.

The fact that the automated model building of EP was more challenging than for TLN and *TcAChE* is probably due to the lower xenon occupancy (0.55), lower redundancy of the data and the lower solvent content as well as lower unit cell symmetry. Particular, the low monoclinic cell symmetry and the resulting redundancy of only 7.1 seem to make a significant difference. For the other two proteins the symmetry is much higher and the redundancy is above ten-fold. After an initial round of 200 building cycles, only 135 out of 330 residues in 19 chains were found. In the light of this disappointing result, visual inspection of the electron density map turned out to be the key step in generating a model for EP with ARP/wARP. An additional ARP/wARP run, with a further 200 building cycles, based on the previously generated model, was successful in tracing an additional 187 residues. Thus, a total of 322 out of 330 residues of EP could be

assigned, with a connectivity index of 0.97. The remaining eight residues could be easily fitted into the electron density map during subsequent refinement.

The phasing, density modification and autotracing with ShelxE_beta was straightforward in all cases and leads, for TLN and EP, to polyalanine models containing 308 and 319 residues, respectively, and for *TcAChE* to a model containing 494 residues.

Subsequently, ARP/wARP jobs were set up based on the polyalanine models of TLN, EP and *TcAChE*. After 50 building cycles, Arp/wARP was able to assign 303 out of 316 residues for TLN (connectivity 94.7 %), 319 out of 330 residues for EP (connectivity 96.9 %), and 507 out of 537 residues for *TcAChE* (connectivity 96.7 %). Here, backbone models were virtually complete after ShelxE-beta and ARP/wARP mainly provided the opportunity to built side-chains into the electron density for model completion. Comparison of the backbone models obtained by ShelxE-beta and the final models (based on C α) revealed good agreement for TLN and EP. For TLN a total of 10 chains were traced with an rms deviation of 0.61 Å for all 308 residues and 0.33 Å for 297 residues after truncation of terminal residues of the individual chains. Similar for EP, 9 chains resulted in an rms deviation of 1.09 Å for all 319 residues, which was drastically reduced to an rms deviation of 0.38 Å after truncation to 303 residues. Fitting was performed using the program ProFit [Martin, A.C.R. and Porter, C.T., <http://www.bioinf.org.uk/software/profit/>]. For *TcAChE* the structural agreement was not calculated since the 494 residues belonged to a total of 32 individual chains resulting from ShelxE_beta. However, visual inspection in COOT revealed some deviations. Figure 22, Figure 23 and Figure 24 clearly show that xenon binds in a deep hydrophobic cavity to TLN, EP and *TcAChE*, respectively. For TLN and EP a single xenon site is observed, while two sites for *TcAChE* were found. In all three cases, the xenon site is bordered by the side-chains of hydrophobic amino acids that create a deep hydrophobic cavity.

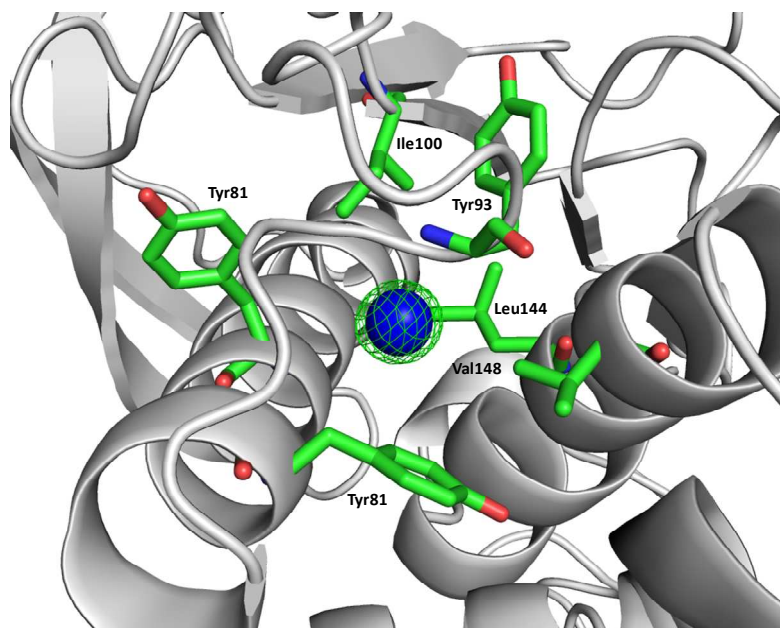


Figure 22: Close up view of the xenon binding site in the xenon/TLN complex. Xenon is shown as a dark blue ball, and interacting side chains of amino-acid residues are displayed as green stick models with oxygen atoms depicted in red, and nitrogen atoms in blue. The electron density ($2F_o - F_c$) for the xenon atom is shown in green at a level of 2σ .

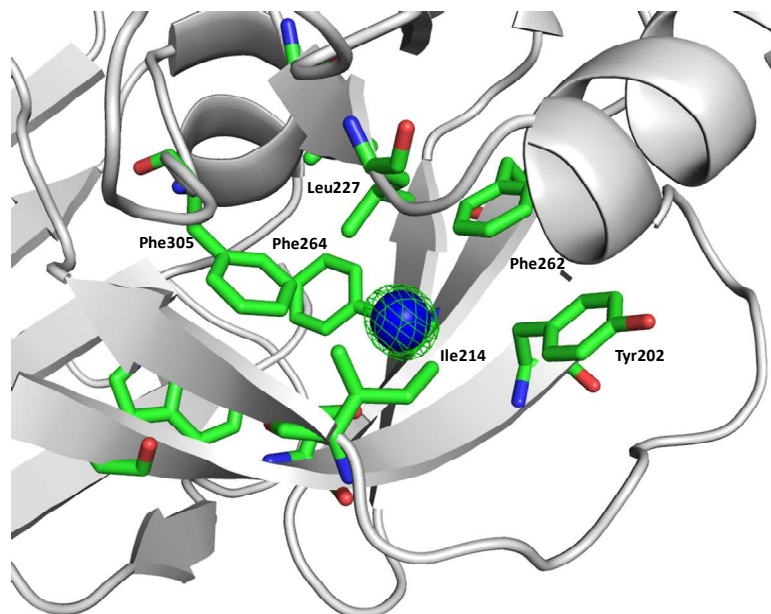


Figure 23: Close up view of the xenon binding site in the xenon/EP complex. Xenon is shown as a dark blue ball, and interacting side chains of amino-acid residues are displayed as green stick models with oxygen atoms depicted in red, and nitrogen atoms in blue. The electron density ($2F_o - F_c$) for the xenon atom is shown in green at a level of 2σ .

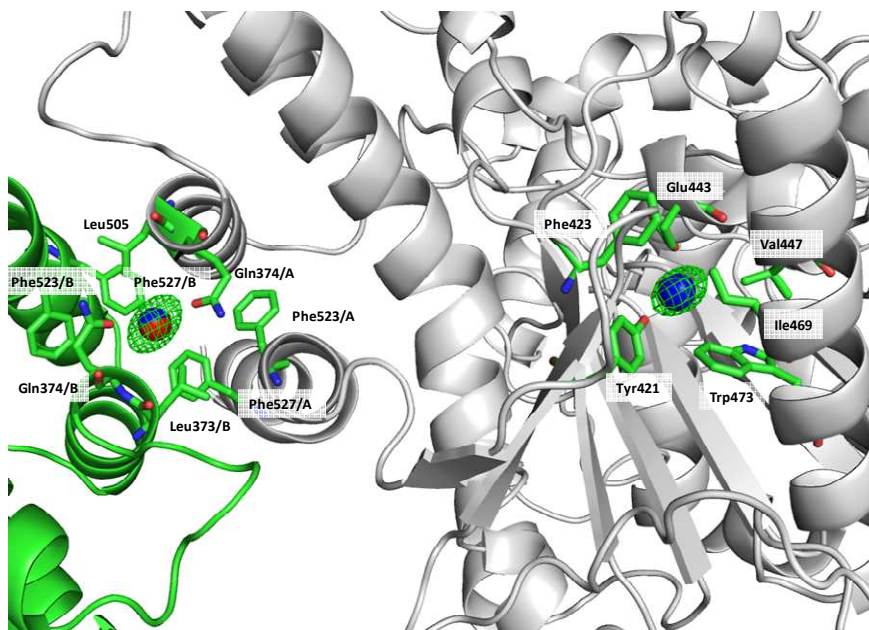


Figure 24: Close up view of the xenon binding sites in the xenon/TcAChE complex. Xenon, bound in a cavity within each monomer, is shown as a dark blue ball, and interacting side chains of amino-acid residues are displayed as green stick models with oxygen atoms depicted in red, and nitrogen atoms in blue. A second xenon atom (blue/red) binds at the interface between two TcAChE monomers. The electron density ($2Fo-Fc$) for both xenon atoms is shown in green at a level of 2σ .

This binding mode agrees with earlier studies (Prangé, Schiltz et al. 1998), as well as with a statistical analysis of the amino acids involved in xenon binding sites, which was performed using Relibase (Hendlich, Bergner et al. 2003), and took into account all the xenon/protein complexes deposited in the PDB (Figure 25). It is interesting to note that 70 % of these residues are either Leu, Val, Phe or Ile.

The phasing statistics listed in Table 2 provide strong evidence that xenon SAD phasing can be applied to *in-house* data using a number of suitable programs and their combinations (see Figure 26).

4.4 Conclusion

In this study, we demonstrate that TLN, EP and TcAChE serve as model proteins for incorporating xenon under pressure. More importantly, for all three proteins, it was possible to perform successful phase determinations via SAD, with *in-house* data from a single (TLN & EP) or double (TcAChE) bound xenon atom to produce interpretable

density maps, using various programs and program combinations for processing, scaling, phasing and model building. ShelxE-beta also offers a fast and robust method to produce initial poly-alanine models for all proteins under investigation.

We feel confident that, in many cases, xenon SAD phasing, using data collected on a home source, may provide an effective, efficient and low-cost alternative to MAD phasing at synchrotron sources.

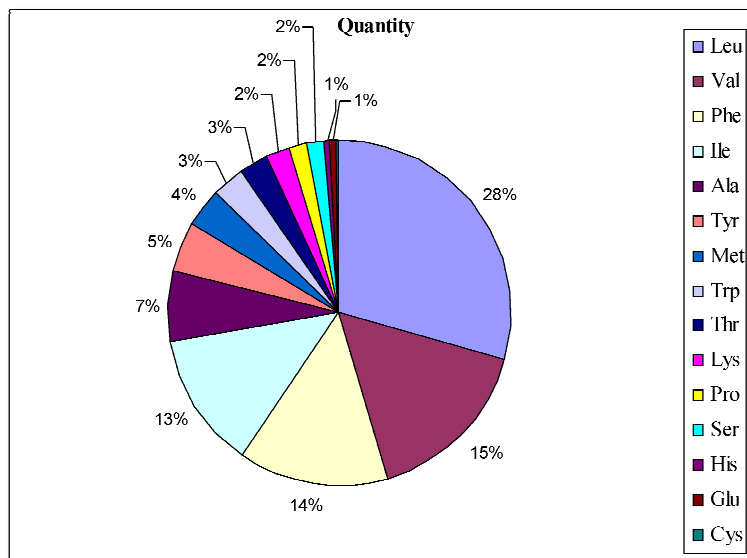


Figure 25: The statistical distribution of amino-acid residues participating in binding sites for xenon as obtained from a Relibase search.

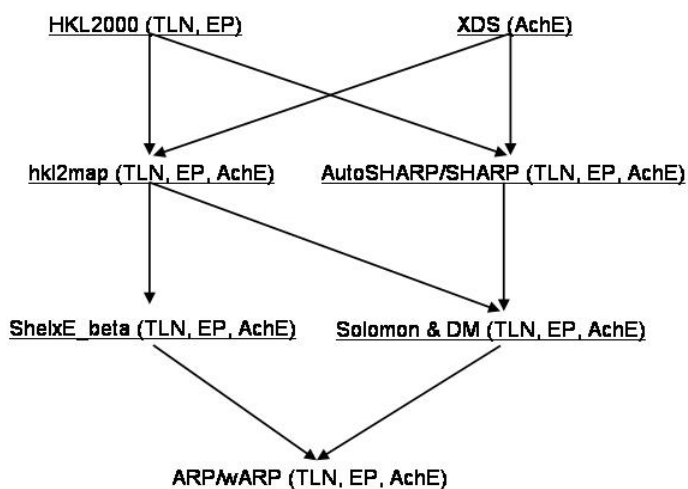


Figure 26: Graphical display of routes to determine the structures of TLN, EP and TcAChE by SAD, with xenon in-house data, using depicted programs for processing, scaling, phasing, density modification and model building, as well as combinations of these programs.

4.5 Weitere Ergebnisse

Im Zuge des experimentellen SAD-Phasing mit *in house* Daten von Xenon-Proteinkomplexen wurden auch die Enzyme tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) und sekretorische Aspartatprotease 2 (Sap2) erfolgreich mit Xenon derivatisiert. Da es aber bis jetzt nicht möglich war, die jeweiligen Proteinstrukturen über die Methode SAD mit inkorporierten Xenon als Schweratomderivat zu bestimmen, wurden diese beiden Xenon-Proteinkomplexe im Manuskript nicht berücksichtigt, sollen aber an dieser Stelle erwähnt werden.

4.5.1 Kristallisation von TGT und Sap2

Die Kristallisation von *Z. mobilis* TGT wurde in einem Zweischrittverfahren mit leichten Modifizierungen des Protokolls von Romier und Kollegen durchgeführt (Romier, Ficner et al. 1996). Zuerst wurden Mikrokristalle nach der Dampfdiffusion-Methode bei Raumtemperatur im hängenden Tropfen erzeugt. Dazu wurden 2 µl Proteinlösung (16.8 mg/ml TGT, 2 M NaCl, 10 mM TRIS-HCL pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) mit 2 µl Reservoirlösung (100 mM MES, pH 5,5, 1 mM DTT, 8 % (w/v) PEG 8.000, 10 % (v/v) DMSO) gemischt. Falls nötig, wurde außerdem nach 24 Stunden ein *cross seeding* der angesetzten Tropfen durchgeführt. Nach ungefähr 24 - 48 Stunden sind kleine Kristalle gewachsen, die dann noch einmal in einen neuen frischen Tropfen aus gleichen Pufferlösungen, wie oben beschrieben, für ein *macro seeding* überführt wurden, um für die Röntgenstrukturanalyse taugliche Kristalle zu erhalten.

Kristalle von *C. albicans* Sap2 wurden gemäß dem Kristallisationsprotokoll von Abad-Zapatero und Kollegen durchgeführt (Abad-Zapatero, Goldman et al. 1996). Sap2-Kristalle wurden ebenfalls durch die Dampfdiffusion-Methode bei Raumtemperatur mit sitzenden Tropfen erzeugt. Hierbei wurde 1 µl Proteinlösung (10 mg/ml Sap2) mit 1 µl Reservoirlösung (23 % PEG 8000, 7 mM Zinkacetat; 40 mM Imidazol-Malat, pH 6.5) vermischt.

Aufgereinigte Sap2-Proteinlösung wurde uns freundlicherweise von der Gruppe von Prof. Joachim Morschhäuser, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

4.5.2 Xenon-Derivatisierung von TGT und Sap2

TGT und Sap2 wurden nach dem gleichen Verfahren, wie es bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben wurde, mit Xenon derivatisiert. Nachdem jeweils ein Proteinkristall auf einen Hampton CrystalCap HT™-Pin montiert war, wurden sowohl die Sap2- als auch die TGT-Kristalle vor der Derivatisierung in Cryo-Puffer getaucht. Der Cryo-Puffer bestand aus 25 % Glycerin und Kristallisationslösung. Im Anschluss wurden die Kristalle einzeln in die Xenonanlage (siehe Abbildung/Figure 12) eingebracht und für 10 min (TGT) bzw. 7 min (Sap2) einer Xenonatmosphäre mit einem Druck von 300 PSI ausgesetzt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Kristalle innerhalb von 15 sec in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.5.3 Datensammlung und Prozessierung

Datensätze von Sap2 und TGT wurden bei einer Temperatur von 100 K an einer Incoatec I μ S Kupfer Mikrofocus-Röhre und mit einem ICT-MAR345 DTB *image plate* Detektorsystem aufgenommen. Für TGT betrug die Belichtungszeit pro Bild 10 min und für Sap2 3 min. In beiden Fällen wurden Oszillationsschritte von $\Delta\phi = 0.5^\circ$ und ein Detektorabstand von 150 mm gewählt. Um eine hohe Genauigkeit der Intensitäten zu gewährleisten wurden die Datensätze für Sap2 und TGT mit hoher Redundanz aufgenommen (Tabelle 4). Die erhaltenen Datensätze wurden anschließend mit dem Softwarepaket HKL2000 (Version 1.98.7) prozessiert und skaliert (Otwinowski and Minor 1997). Tabelle 4 zeigt die zusammengefassten Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken.

Datensatz	TGT^a	Sap2^a
Wellenlänge [Å]	1.5418	1.5418
Raumgruppe	C2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter [Å, °]	a: 90.5 b: 64.6 c: 71.1 β: 93.0	a: 49.2 b: 63.6 c: 98.2
$I/\sigma(I)^b$	26.5 (2.5)	18.4 (3.2)
Auflösung [Å] ^b	50.00 – 2.19 (2.23 – 2.19)	50.00 – 2.02 (2.05 – 2.02)
Vollständigkeit (%) ^b	90.5 (53.0)	96.1 (69.3)
Redundanz ^{b;c}	6.1 (3.0)	12.7 (4.2)
Mosaicität	0.8	0.7
Anzahl unabhängiger Reflexe	19305	20054
$R_{\text{sym}}(\%)^c$	6.2 (35.1)	15.2 (36.4)
Matthewskoeffizient [Å ³ /Da]	2.4	2.1
Lösungsmittelanteil [%]	47.8	40.5

^aWerte wurden mit HKL2000 prozessiert; ^bWerte in Klammern stehen für den höchsten Auflösungsbereich; ^c $R_{\text{sym}} = \sum |I - \bar{I}| / \sum I$

Tabelle 4: Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken für TGT und Sap2

4.5.4 Phasierungsstatistiken

Mit den prozessierten TGT- bzw. Sap2-Daten wurde genauso verfahren, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Für beide Proteine wurde zum Phasieren sowohl das graphische Interface hkl2map (Version 0.2) als auch das Programm AutoSHARP/SHARP (Version 3.4.0) verwendet. Im Anschluss an das Phasieren mit hkl2map wurde versucht, mit dem Programm ShelxE_beta ein Polyalaninmodell des jeweiligen Proteins zu erzeugen. Mit den Phasen, die durch AutoSHARP/SHARP erhalten wurden, wurde anschliessend versucht, mit dem Programm ARP/wARP ein Proteinmodell für das jeweilige Enzym zu erstellen. Zuvor wurde die Elektronendichte, die aus den erhaltenen Phasen berechnet wurde, mit dem Programm DM (density modification; Version 6.0) verbessert. Sowohl ARP/wARP als auch DM sind in der ccp4i Benutzeroberfläche (Collaborative Computational Project, Number 4) implementiert. Die Phasierungsstatistiken für TGT und Sap2 sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Datensatz	TGT	Sap2
Auflösungsbereich (Å)	50 – 2.19	50 – 2.02
d''/sig(d'') (ShelxC) max/min	1.77 – 0.95	3.13 – 1.07
Auflösungsmaximum (ShelxD) (Å)	2.7	2.5
CC _{max} (ShelxD)	10.99	13.68
Xenonatome (verfeinerte Besetzung)	2 (0.40; 0.25)	1 (0.56)
Kontrast (ShelxE_beta) (%)	60.3	58.8
CCmax (ShelxE_beta) (%)	8.7	3.9
ø FOM (ShelxE_beta)	0.563	0.555
Gefundene Reste (ShelxE_beta) / orig.	49 /386	25/342
Anomale Phasierungskraft (SHARP) ^a	0.220	0.223
Gefundene Reste (ARP/wARP) / orig.	91/386	100/342

^aanomalous phasing power $[(|\Delta F^2_{PH}(obs)| - |\Delta F^2_{PH}(calc)|)^2]^{1/2}$

Tabelle 5: Phasierungsstatistiken für TGT und Sap2

4.5.5 Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der Tatsache, dass die 3D-Strukturen von TGT und Sap2 bereits bekannt und zu den jeweiligen Komplexstrukturen isomorph sind, konnten diese durch Molekularen Ersatz bestimmt werden. Die TGT- bzw. Sap2-Xenonkomplexe wurden anhand der jeweiligen Koordinaten, der in der PDB deponierten Strukturen 1Y5V (Stengl, Meyer et al. 2007) für TGT und 1ZAP (Abad-Zapatero, Goldman et al. 1996) für Sap2, bestimmt. Dadurch war es möglich, vorab zu erkennen, ob ein oder mehrere Xenonatome im Protein gebunden haben. Der Bindungsmodus von Xenon in TGT und Sap2 stimmt mit dem in Kapitel 2.3 beschriebenen überein (Abbildung 27 & Abbildung 28).

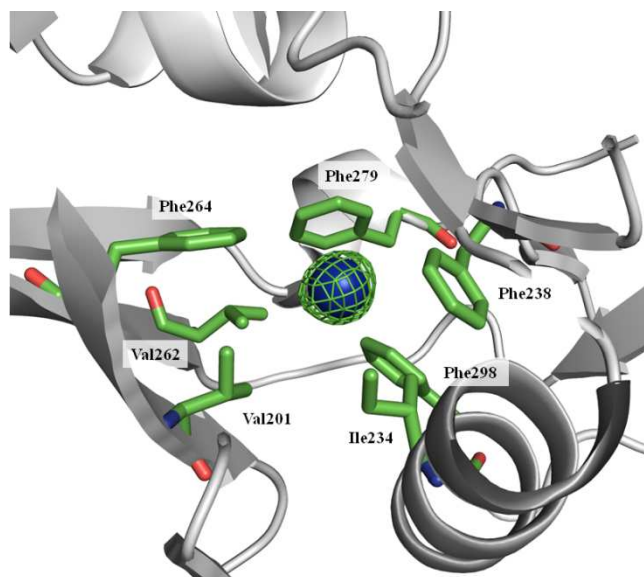


Abbildung 27: Nahansicht der Xenonbindetasche des Xenon/Sap2-Komplexes. Xenon ist als Kugel (dunkel blau) und die Bindetasche formenden Aminosäuren (grün) sind im „stick“- Modus dargestellt. Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die Elektronendichte ($2F_o - F_c$) für das Xenonatom ist in grün dargestellt bei 2σ .

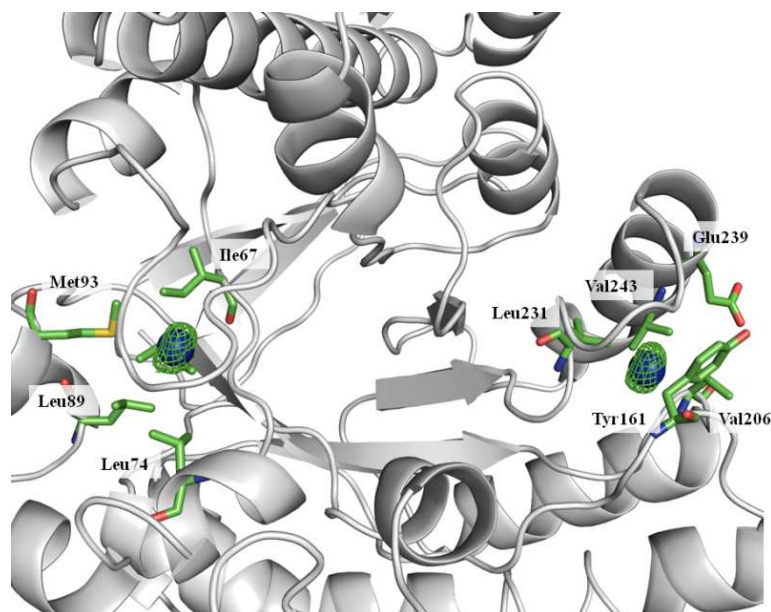


Abbildung 28: Nahansicht der Xenonbindetasche des Xenon/TGT-Komplexes. Xenon ist als Kugel (dunkel blau) und die Bindetasche formenden Aminosäuren (grün) sind im „stick“- Modus dargestellt. Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die Elektronendichte ($2F_o - F_c$) für das Xenonatom ist in grün dargestellt bei 2σ .

Obwohl zu erkennen ist, dass ein bzw. zwei Xenonatome in TGT und Sap2 binden, war es nicht möglich, die jeweiligen Strukturen über SAD-Phasing zu bestimmen. Gründe hierfür sind sicherlich die geringe Xenonpopulation in den jeweiligen Komplexen und dem damit einhergehenden schwachen anomalen Signal, was sich dann auch in der geringen „Phasing-Power“ widerspiegelt. Weiter wäre im Falle von TGT auch die niedrig symmetrische Raumgruppe C2 zu nennen und die damit einhergehende, vergleichsweise geringe Redundanz sowie die Genauigkeit der gesammelten Daten.

Interessant hierbei ist zu erwähnen, dass sowohl die Aspartatprotease EP als auch Sap2 eine xenonbindende Kavität besitzen. Vergleicht man diese beiden Komplexe miteinander, kann man erkennen, dass diese Kavität sich in der gleichen Domäne sehr dicht beieinander befindet (Abbildung 29). Dieses lässt die Vermutung zu, dass alle Aspartatproteasen der A1 Familie eine Kavität besitzen, die zur Aufnahme von Xenon geeignet ist. Um diese Aussage zu manifestieren, wäre es jedoch notwendig, weitere Xenonkomplexe z.B. mit Renin oder Pepsin herzustellen.



Abbildung 29: Überlagerung der beiden Aspartatproteasen Sap2 (rot) und EP (gelb). Beide Strukturen sind im Cartoonmodell, die jeweiligen Xenonatome (Sap2: dunkel blau; EP: violett) als Kugel dargestellt.

5 Experimental Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery

Bei dem folgenden Text handelt es sich um ein Manuskript, welches in Kürze in einer Naturwissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht werden soll. Es beschreibt zusammenfassend den Verlauf des Ausleuchtens von Bindetaschen verschiedener Proteinsysteme mit kleinsten, hochlöslichen Sondenmolekülen. Die Formatierungen wurden dem Format der vorliegenden Arbeit angepasst. Die international übliche naturwissenschaftliche Sprache ist Englisch. Deshalb ist das Manuskript in dieser Sprache verfasst.

5.1 Introduction

High-throughput-screening (HTS) is still considered the major source for lead discovery in pharmaceutical drug research (Hohwy, Spadola et al. 2008). However, the success rate of finding promising leads by HTS is still after 20 years of experience rather unsatisfactory even though well tailored screening libraries are scanned (Brown and Superti-Furga 2003). Worldwide, pharmaceutical companies maintain enormous HTS libraries with up to several million compounds. Even in light of these large screening libraries the scope and novelty of the discovered compounds appears to be limited. Moreover, the screening libraries are often compiled by compounds synthesized in late-phase drug discovery projects. Therefore, more drug-like than lead-like molecules end up in the screening facilities (Geschwindner, Olsson et al. 2007). Due to this fact many of the molecules detected in HTS leave little room for optimisation concomitantly keeping their existing drug-likeness (Lipinski 2004). Lead optimisation involves attachment of novel and additional substituents which will for molecules already of drug size easily exceed their molecular weight and hydrophobicity beyond the limits acceptable for drug-like molecules (Teague, Davis et al. 1999).

Contrary to HTS, fragment-based lead discovery (FBLD) starts with molecules of low molecular weight, typically in a range of 120-250 Da, however, binding affinities will only attain milli- to micro-molar range (Rees, Congreve et al. 2004). To better estimate

the actual perspective of a hit in FBLD “ligand efficiency” is consulted as descriptor, because it ranks the actually achieved potency of a discovered hit with respect to its potential to be improved (Hopkins, Groom et al. 2004; Abad-Zapatero and Metz 2005). Nevertheless, the combination of high ligand efficiency with sufficient room for optimisation makes FBLD very promising. Optimisation strategies following a fragment growing or fragment linking concept can easily result in highly potent and prospective leads (Erlanson, McDowell et al. 2004). Improvement of biophysical techniques such as high throughput crystallography (Carr and Jhoti 2002) or NMR screening (Shuker, Hajduk et al. 1996) allow characterisation of fragment complexes and provide a promising alternative to HTS. To stress the relevance of fragment-based approaches it has to be mentioned that the first drug candidates from this approach are meanwhile in clinical trials (Hajduk and Greer 2007).

The present study attempts to merge the concepts of multiple solvent crystal structure determination (MSCS) and FBLD. MSCS was developed in the mid nineties as a new crystallographic approach in the group of Dagmar Ringe. The idea of this concept was to soak small organic solvent molecules into protein binding sites to map out experimentally their active sites. A case study was performed using porcine pancreatic elastase (Allen, Bellamacina et al. 1996). In contrast to the MSCS approach we want to search for small highly soluble molecules with a molecular weight lower than that of standard-sized fragments but with general applicability to a broad range of proteins to map out their hydrophobic and hydrophilic active site areas. They should detect the most favourable regions for ligand binding in protein binding pockets. However, our goal is to find small soluble molecules which mark not only the position of functional groups but also the putative scaffold position, i.e. an aromatic ring system to create a protein-based pharmacophore.

Furthermore, the active sites mapped by this experimental approach can be used as a reference to develop and validate *in silico* methods to calculate *hotspots* of binding, such as implemented in the program DrugScore (Gohlke, Hendlich et al. 2000). By superimposing our experimentally determined probe molecules with already characterised protein-ligand complexes in the PDB allows corroborating the relevance of their binding geometries in respect to the definition of a protein-based

pharmacophore. An important criterion for the selection of our probe fragments is a very high solubility since we have to anticipate very low binding affinity which can only be compensated by high ligand concentration used during soaking. In this study we soaked a selection of different small and highly soluble molecules such as phenol, aniline, 1,2-propanediol, urea and N-methylurea into crystals of different protein targets.

Due to their small size and the limited number of interaction points that fragments can form with a protein the affinity of these compounds is in general very weak. Such weak binding requires robust screening methods to reliably detect binding. Usually pharmaceutical industry performs fragment screening either by NMR spectroscopy (Lepre, Moore et al. 2004) or biophysical assays such as surface plasmon resonance (Metz, Otteleben et al. 2003). In this study, we performed the screening of small highly soluble molecules by X-ray crystallography.

As target proteins we have selected the zinc protease thermolysin (TLN), the protein kinase A (PKA) and the D-xylose-isomerase from *Streptomyces rubiginosus* (DXI). These enzymes are generally considered as prototypical model targets and are therefore well documented in literature. We extended our studies to the a enzyme of the non-mevalonate pathway, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-synthase (IspD), for which currently almost no ligands are known.

5.2 Methods

5.2.1 Crystallization

Native TLN (purchased from Calbiochem) crystals were prepared as described by Holmes and Matthews with the following slight modifications (Holmes and Matthews 1982). TLN was predissolved in 100 % DMSO and than mixed 1:1 in 3.26 M CsCl/0.10 M Tris/HCl (pH 7.5) to a final TLN concentration of 4.0 mM. Crystals were grown using the sitting-drop vapor diffusion method, with water as the reservoir solution.

PKA was kindly provided by Merck Serono, Darmstadt. Crystals of the catalytic subunit of PKA were grown according to the protocol of Zheng et al. with slight

changes (Zheng, Knighton et al. 1991; Zheng, Knighton et al. 1992). PKA (32 mg/ml) was dialyzed into a buffer of 5 mM Bis-Tris-propane, 75 mM LiCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA and 5 mM MES pH 6.9. Crystals were grown by sitting drop vapor diffusion method by additional 0.4 % Mega8 and 0.28 μ M PKI (protein kinase inhibitor) added to the buffer and using 16 – 21 % ethanol as reservoir solution.

Before crystallization, DXI (purchased from Hampton Research) was dialyzed against 10 mM HEPES pH 7.0. Crystals were prepared using the sitting-drop vapor diffusion method. DXI (30 mg/ml) was mixed 1:1 with the reservoir solution containing 20 – 24 % (v/v) 1,2-propanediol, 0.2 M MgCl and 50 mM MES pH 6.0.

IspD was cloned and expressed in *E. coli*. This procedure as well as the purification has been described by Richard et al. (Richard, Bowman et al. 2001). After purification IspD crystals were grown using the sitting-drop vapor diffusion method. IspD (39 mg/ml) was mixed 1:1 with the reservoir solution containing 30 % 1,2-propanediol, 20 % (v/v) PEG-400 and 0.1 M HEPES pH 7.5.

5.2.2 Fragment Soaking

Before soaking, TLN crystals were transferred into a buffer containing 30 % isopropanol and 100 mM Tris/HCl pH 7.5 for 2-3 days. Complexes of 3-bromo-phenol, aniline, urea, N-methylurea and 1,2-propanediol were achieved by soaking the respective molecules in a concentration of 12.5 – 100 mM for 10 min – 24 h into the protein crystal.

For better stability properties PKA crystals were cross-linked with glutaraldehyde for 1 h. Subsequently phenol (200 mM) and N-methylurea (100 mM) were soaked into the protein crystals for 10 – 45 min.

IspD and DXI 1,2-propanediol complexes were obtained by co-crystallization with 20 – 30 % 1,2-propanediol.

5.2.3 Data Collection and Processing

The soaked crystals of TLN and PKA were transferred for ~10 s into a cryo-buffer containing 20 – 30 % glycerol respectively 1,4-butanediol as cryoprotectant and were afterwards directly flash-frozen in liquid nitrogen. In the case of IspD and DXI no additional cryo protection was needed because of the crystallization conditions. Data sets of TLN in complex with urea, N-methylurea and 1,2-propanediol were collected on an Incoatec, I μ S copper microfocus source, using a MAR345 DTB image plate detector system at 100 K. The data set of DXI in complex with 1,2-propanediol was collected using a Rigaku RU-H3R rotating-anode generator at 50 kV and 90 mA equipped with focusing mirrors (Xenocs mirrors) and an R-AXIS IV image-plate system under cryo conditions. Data sets of TLN in complex with aniline and 3-bromo-phenol as well as PKA in complex with N-methylurea were collected at the BESSY II, (Berlin) beamline 14.1 and 14.2. Data sets for PKA in complex with phenol and IspD in complex with 1,2-propanediol were collected at the SLS, (Villigen) beamline XD06A. Processing and scaling of the data were performed with the HKL2000 package (Otwinowski and Minor 1997). Details of each data set are listed in Table 6.

5.2.4 Structure determination and refinement

All structures were determined by either difference Fourier techniques performing initial rigid-body refinement or molecular replacement with Phaser (Storoni, McCoy et al. 2004). The coordinates of the respective apo structure were used (TLN apo-structure PDB code: 2A7G, (Mueller-Dieckmann, Panjikar et al. 2005); PKA apo-structure PDB code: 3DNE, (Orts, Tuma et al. 2008); IspD apo-structure PDB code: 1VGT (Badger, Sauder et al. 2005) and DXI apo-structure PDB code 1XIC), (Carrell, Hoier et al. 1994). Initial refinement included gradient energy minimization, simulated annealing, and B-value refinement using the CNS program package (Brunger 1998).

Further refinement cycles were done with the program SHELXL due to the high resolution of the obtained data (Sheldrick 2008). Here, at least 20 cycles of conjugate gradient minimization were performed with default restraints on bonding geometry and B-values. For R-free calculations, 5 % of all data were used. Amino acid side chains

Experimental Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery

were fitted to σA -weighted $|F_o| - |F_c|$ and $2|F_o| - |F_c|$ electron-density maps using COOT (Emsley and Cowtan 2004). Additionally, water and glycerol molecules (cryoprotectant) and the respective fragments were located and subsequently included in further refinement cycles. In the last refinement, riding hydrogen atoms were placed for the protein (not for ligands) without using additional parameters. For all structures the refinement statistics are listed in Table 6.

<i>Crystal data</i>	<i>TLN-aniline</i>	<i>TLN-bromo-phenol</i>	<i>TLN-urea</i>	<i>TLN-N-methylurea</i>	<i>TLN-1,2-propanediol</i>	<i>PKA-phenol</i>	<i>PKA-N-methylurea</i>	<i>DXI-1,2-propanediol</i>	<i>IspD-1,2-propanediol</i>
PDB code:	3MS3	3MSA	3MSF	3MSN	3N21	3NX8	3N47	3N4A	3N9W
Data collection and processing									
λ [Å]	0.91841	0.91841	1.5418	1.5418	1.5418	1.000	0.91841	1.5418	1.000
Space group	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	I222	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters									
a [Å]	93.0	93.1	92.6	93.1	93.1	72.2	72.4	93.3	41.2
b [Å]	93.0	93.1	92.6	93.1	93.1	77.1	76.1	99.1	8.2
c [Å]	129.7	128.5	128.7	129.2	129.2	79.6	80.0	102.7	133.7
Diffraction data									
Resolution [Å]	25-1.54	25-1.66	25-2.09	25-1.97	25-1.87	40-2.0	25-2.08	25-1.93	25-1.90
Unique reflections	49197 (2432) ^[a]	37575 (1846) ^[a]	19899 (967) ^[a]	23193 (1143) ^[a]	39474 (1930) ^[a]	30116 (1674)	26955 (1332) ^[a]	34909 (1557) ^[a]	34346 (1373) ^[a]
R _{sym} [%] ^[b]	3.7 (27.6) ^[a]	8.3 (45.1) ^[a]	13.4 (47.6) ^[a]	9.1 (47.2) ^[a]	9.1 (48.8) ^[a]	4.8 (41.5)	7.7 (48.7) ^[a]	8.0 (13.8) ^[a]	4.9 (28.7) ^[a]
Completeness	99.1 (99.4) ^[a]	94.9 (94.4) ^[a]	99.7 (99.9) ^[a]	96.1 (98.3) ^[a]	99.4 (99.9) ^[a]	98.3 (83.7)	98.8 (99.9) ^[a]	99.1 (89.0) ^[a]	94.5 (78.0) ^[a]
Redundancy	8.5 (7.8) ^[a]	9.4 (9.6) ^[a]	6.8 (6.6) ^[a]	7.3 (6.5) ^[a]	5.7 (5.8) ^[a]	6.9 (4.8)	4.4 (4.4) ^[a]	6.7 (4.5) ^[a]	3.3 (2.9) ^[a]
I/ σ	48.3 (5.7) ^[a]	21.6 (4.8) ^[a]	16.5 (4.7) ^[a]	22.0 (3.9) ^[a]	15.3 (3.2) ^[a]	37.2 (2.6)	18.1 (2.4) ^[a]	20.5 (10.8) ^[a]	21.8 (2.9) ^[a]
Refinement									
Program	ShelxL	ShelxL	ShelxL	ShelxL	ShelxL	ShelxL	ShelxL	ShelxL	ShelxL
Resolution range	10-1.54	10-1.66	10-2.09	10-1.97	10-1.87	10-2.0	10-2.08	10-1.93	10-1.91
Reflections used in refinement	47501	36281	16868	21974	26610	28045	25137	34311	32991
Final R values									
R _{free} (F _o >4 σ ;F _o) ^[c]	19.8; 19.2	21.0; 20.0	26.4; 24.8	25.0; 23.1	25.0; 23.6	28.8; 26.3	25.4; 27.3	27.0; 28.9	18.7; 18.2
R _{work} (F _o >4 σ ;F _o) ^[d]	14.1; 13.7	16.6; 16.0	18.4; 17.4	17.6; 16.4	17.7; 16.8	21.9; 20.7	18.7; 17.3	21.6; 20.3	14.7; 14.4

Experimental Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery

No of atoms (non-hydrogen)									
Protein	2448	2438	2416	2426	2420	2814	2767	3013	3092
Water molecules	235	219	163	188	185	109	140	351	106
Ions and other atoms (non-hydrogen)	38	17	19	13	10	21	10	13	15
Ramachandran plot ^[e]									
Most favoured regions (%)	87.8	88.5	84.8	86.7	85.2	90.2	88.9	91.2	91.6
Additional allowed regions (%)	11.1	10.7	14.4	12.6	13.7	9.5	10.5	8.2	8.4
Generously allowed regions (%)	0.7	0.4	0.4	0.4	0.7	0.3	0.7	0.6	0
Disallowed regions (%)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0	0	0	0
Mean B-factors (Å ²)									
Protein atoms	16.8	17.9	27.3	21.8	22.1	43.4	35.6	18.1	28.6
Ligand	25.4	18.4	38.1	29.9	29.4	40.5	37.6	23.2	22.3
Water molecules	27.8	26.1	33.1	29.8	30.2	41.4	39.0	27.0	37.3
RMSD bond lengths [Å]	0.009	0.008	0.005	0.005	0.006	0.007	0.005	0.007	0.008
RMSD bond angels	2.9	2.5	2.0	2.1	2.1	1.9	2.1	2.3	2.2

^[a]Values in parenthesis are statistics for the highest-resolution shell. ^[b] $R_{\text{sym}} = \sum |I - \bar{I}| / \sum I$. ^[c] R_{free} was calculated as for R_{work} , but on 5% of the data excluded from refinement. ^[d] $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} |F_o - F_c| / \sum_{\text{hkl}} |F_o|$. ^[e]From Procheck (Laskowski, MacArthur et al. 1993).

Table 6: Data collection and refinement statistics

5.2.5 DrugScoreHotSpots

For the calculation of *hotspots* for all protein-fragment complexes the respective enzyme structure was used. The fragment and water molecules were not considered during *hotspot* analyses in order to derive sites of favorable interactions with the non-complexed binding pocket. The atom-type assignment is based on the classification in DrugScore^{CSD} (Velec, Gohlke et al. 2005).

5.3 Results and Discussion

Fragment hit characterisation by X-ray crystallography

Thermolysin: As described in the study of English et al. phenol binds into the S1' pocket of TLN (PDB code 1FJW) (English, Groom et al. 2001). For reasons of better crystallographic detection, we decided to use the phenol derivative 3-bromo-phenol containing strongly diffracting bromine. As expected, 3-bromo-phenol binds in virtually the same fashion as previously found by English et al. As depicted in Figure 30a and b both, phenol and 3-bromo-phenol bind into the S1' pocket of TLN forming hydrogen bonds to Glu 143 and a long distance electrostatic interaction (4.1 – 4.4 Å) to the catalytic zinc ion. Even though this fragment soaking was successful we decided in the following to proceed with unsubstituted phenol because of the higher logP value (2.63 vs. 1.48 (<http://www.emolecules.com>)) of 3-bromo-phenol and because its inferior solubility put some limitations on this molecular probe.

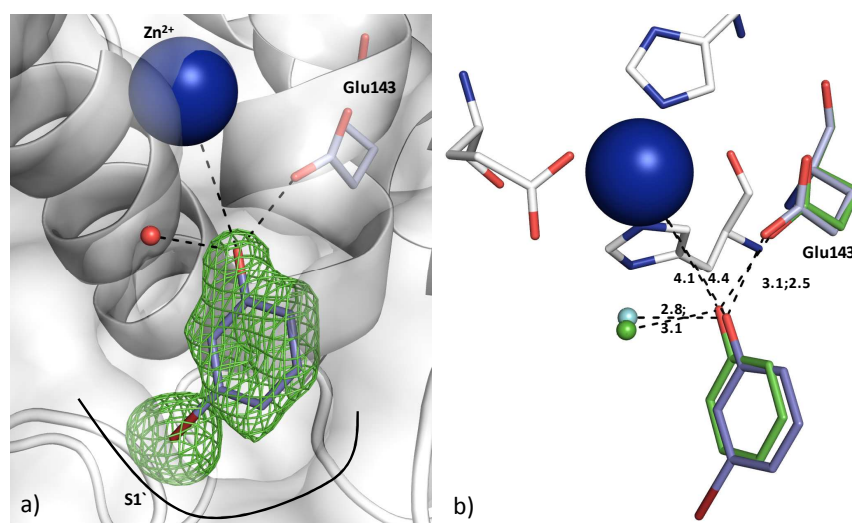


Figure 30: *a:* Surface representation of the S1' pocket of TLN. The solvent-accessible surface of the protein is shown in gray. Amino acids involved in interactions with 3-bromo-phenol (blue) are shown in light-blue stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue, bromine in brown and the catalytic zinc ion is shown as blue sphere. The electron density (2Fo-Fc) for the 3-bromo-phenol molecule is shown in green at a level of 2.0 σ . *b:* Close up view of the phenol/3-bromo-phenol binding geometry in the TLN complex. Phenol is shown in green and 3-bromo-phenol in blue. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as green stick models for phenol, in light-blue stick models for 3-bromo-phenol and as white stick models for the zinc coordinating residues (Glu 166, His146 and His 142). In all cases, oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue, bromine in brown, the catalytic zinc ion is shown as blue sphere and water molecules as small spheres. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner. Distances are given in Å.

In addition, we decided to soak other small soluble molecules with varying properties in concentrations of 12.5 – 100 mM for 15 min – 24 h (for details see experimental section) into TLN crystals. X-ray screening revealed apart from phenol, aniline, urea, N-methylurea and 1,2-propanediol. In the case of 1,2-propanediol a racemate mixture was used, therefore in some cases we could detect the R-enantiomer and in others the S-enantiomer, as judged by the shape of the electron density. Similar to phenol, aniline binds also in the S1'-pocket of TLN (Figure 31a). Surprisingly, aniline assumes a different binding mode when compared to phenol. The aromatic ring system coincides with the binding pose in the phenol complex, but the amino functionality binds via hydrogen bonds to Glu 143, Ala 113 and Asn 112 and does not form the long-range electrostatic interaction with the zinc ion. The deviating orientation of the amino group results in an induced fit adaption of Glu 143 movement of 1.8 Å towards Ala 113 and also Asn 112 is in a slightly twisted orientation (Figure 31b).

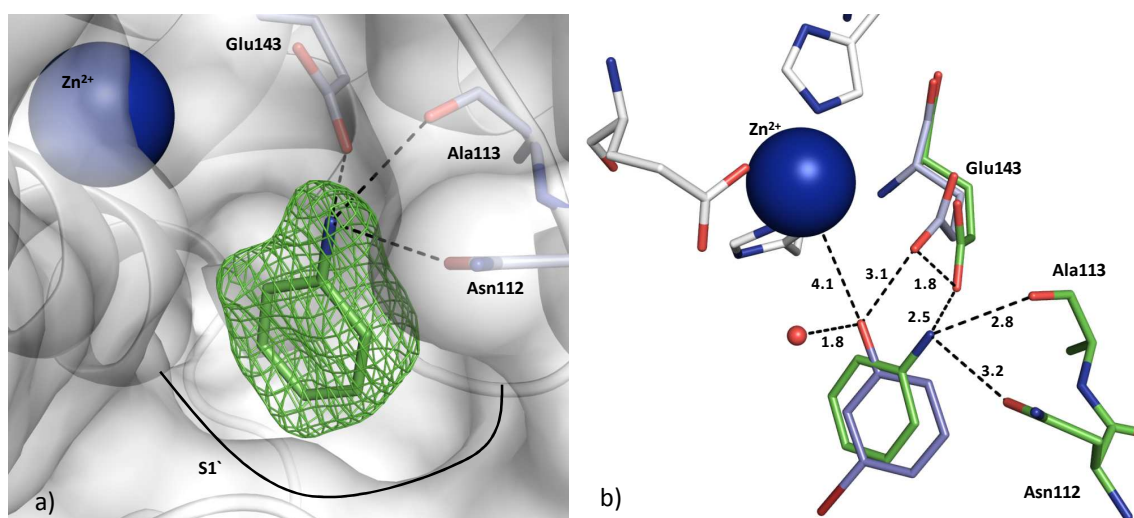


Figure 31: *a:* Surface representation of the S1' pocket of TLN. The solvent-accessible surface of the protein is shown in gray. Amino acids involved in interactions with aniline (green) are shown as white stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue and the catalytic zinc ion is shown as blue sphere. The electron density (2Fo-Fc) for the aniline molecule is shown in green at a level of 2.0 σ . *b:* Close up view of the aniline/3-bromo-phenol binding geometry in the TLN complex. Aniline is shown in green and 3-bromo-phenol in blue. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as green stick models for aniline, in light-blue stick models for 3-bromo-phenol and as white stick models for the zinc coordinating residues (Glu 166, His146 and His 142). In all cases, oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue, bromine in brown, the catalytic zinc ion is shown as blue sphere and water molecules as small spheres. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

Soaking experiments with urea as a probe molecule involves the complication that the overall carbonyl and amino groups appear similar in the difference electron density map and cannot be differentiated by the overall shape of the molecule. This complication stimulated us to also use N-methylurea as a lower symmetric derivative of urea. This molecule allows distinguishing carbonyl and amino groups in the electron density map. In both complexes with TLN one molecule is found in the S1' pocket (Figure 32a & b). Interestingly, as indicated in Figure 34c, N-methylurea binds somewhat differently to urea and must therefore be regarded as a probe with deviating properties compared to urea. In the S1' subsite N-methylurea adopts a binding pose which is rotated by 90° compared to the urea molecule. The position of the urea carbonyl oxygen is occupied in the N-methylurea complex by a picked up water molecule. The latter mediates a hydrogen bond network between Arg 203 and the carbonyl group of N-methylurea. In the case of urea, the carbonyl oxygen is directly H-bonded to the guanidine group of Arg 203 and forms an additional H-bond to the zinc coordinated water molecule. In both cases additional hydrogen bonds are formed to Glu 143, Ala 113 and Asn 112.

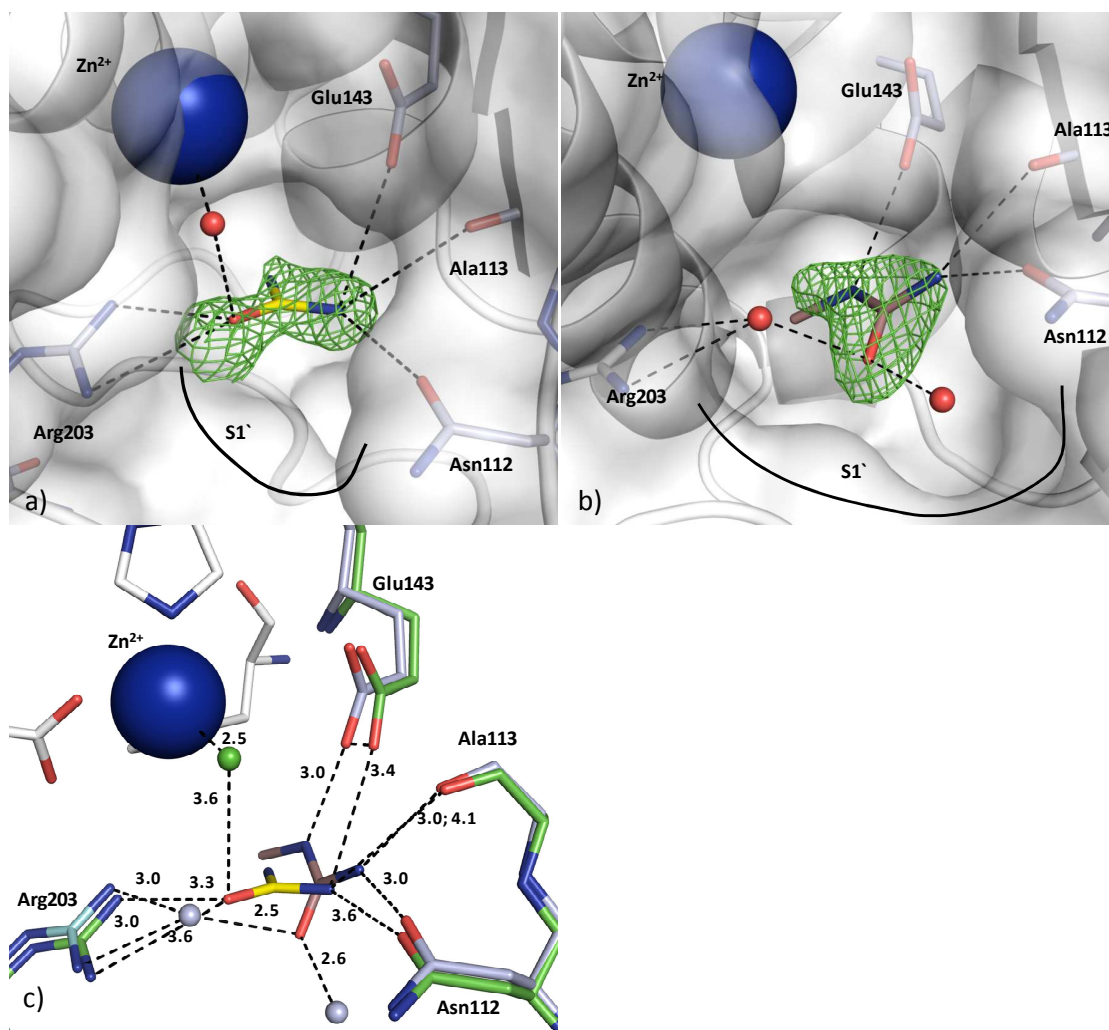


Figure 32: *a:* Surface representation of the S1' pocket of TLN. The solvent-accessible surface of the protein is shown in gray. Amino acids involved in interactions with urea (yellow) are shown in light-blue stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue and the catalytic zinc ion is shown as blue sphere. The electron density (2Fo-Fc) for the urea molecule is shown in green at a level of 2.0 σ . *b:* Surface representation of the S1' pocket of TLN. The solvent-accessible surface of the protein is shown in gray. Amino acids involved in interactions with N-methylurea (violet) are shown in white stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue and the catalytic zinc ion is shown as blue sphere. The electron density (2Fo-Fc) for the N-methylurea molecule is shown in green at a level of 2.0 σ . *c:* Close up view of the urea/N-methylurea binding geometry in the TLN complex. Urea is shown in yellow and N-methylurea in violet. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as green stick models for urea, including the respective water, in light-blue stick models for N-methylurea, including the respective water and as white stick models for the zinc coordinating residues (Glu 166, His146 and His 142). In all cases, oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue, the catalytic zinc ion is shown as blue sphere and water molecules as small spheres. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

The binding pose of S-1,2-propanediol in the S1' pocket of TLN is displayed in Figure 35a and 35b. Interestingly, S-1,2-propanediol combines the previously described binding modes of 3-bromo-phenol, aniline, urea and N-methylurea by forming hydrogen bonds on one site with the hydroxyl group in position 2 to Glu 143 and the backbone oxygen of Ala 113 and on the other side with the hydroxyl group in position 1 to the guanidinium group of Arg 203. This binding mode indicates why the S-enantiomer is more favoured than the R-enantiomer.

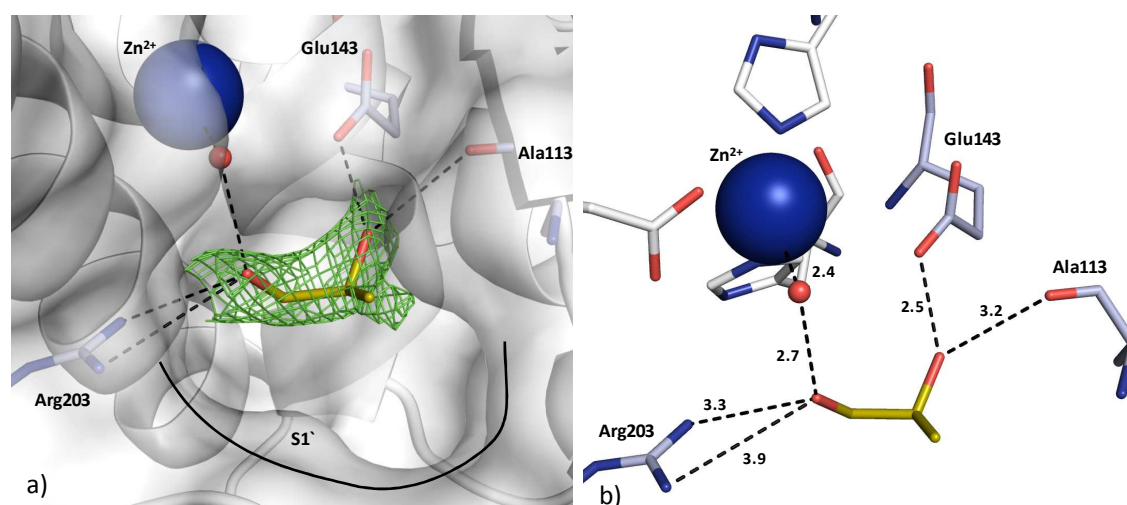


Figure 33: *a:* Surface representation of the S1' pocket of TLN. The solvent-accessible surface of the protein is shown in gray. Amino acids involved in interactions with S-1,2-propanediol (olive) are shown in white stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue and the catalytic zinc ion is shown as blue sphere. The electron density (2Fo-Fc) for the S-1,2-propanediol molecule is shown in green at a level of 2.0 σ. *b:* Close up view of the S-1,2-propanediol binding geometry in the TLN complex. S-1,2-propanediol is shown in olive. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as light-blue stick models for S-1,2-propanediol and as white stick models for the zinc coordinating residues (Glu 166, His146 and His 142). In all cases, oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue, the catalytic zinc ion is shown as blue sphere and water molecules as small spheres. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

Protein Kinase A: After successful active site mapping of TLN we decided to apply our most promising probe fragments to other proteins. Our next choice was PKA, a well-established protein kinase (Davies, Reddy et al. 2000). After cross-linking the protein crystals with glutaraldehyde for 1 hour we soaked the respective fragments with a concentration of 100 – 200 mM for 10 – 45 min (details see experimental section).

The crystal structure of PKA in complex with phenol shows three bound phenol molecules. Two address the active site of the protein (Figure 34a), while a third phenol molecule is found in a remote position on the protein surface. The binding mode of the latter will not be further discussed. The first phenol probe addresses the hinge region adopting a binding mode which allows the hydroxyl group to act simultaneously as H-bond donor to the backbone carbonyl groups of Glu 121 and Val 123 (2.9 – 4.3 Å) and acceptor to the backbone amino group of Val 123 (2.8 Å). This type of interaction pattern is commonly found for many potent kinase inhibitors. The ring plane of the second phenol is twisted approximately by 90° and occupies the sugar subpocket. Its hydroxyl group interacts with Glu 127, the backbone carbonyl of Leu 49 and one water molecule. The phenyl moiety is located directly below the glycine rich loop (Figure 34b). This usually very flexible loop is fixed in the present structure by two hydrogen bonds formed between the backbone NH and the hydroxyl group of Ser 53 and the carboxylate of Glu 184.

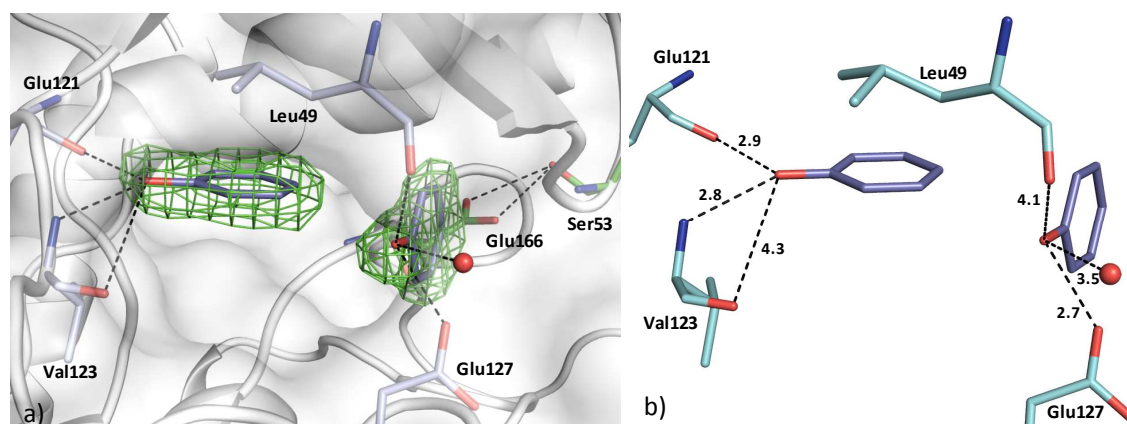


Figure 34: *a:* Surface representation of the active site of PKA. The solvent-accessible surface of the protein is shown in gray. Amino acids involved in interactions with phenol (blue) are shown in light-blue stick models and the residues Glu 166 and Ser 53 are shown in green stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. The electron density (2Fo-Fc) for the phenol molecule is shown in green at a level of 1.5 σ . *b:* Close up view of the phenol binding geometry in the PKA complex. Phenol is shown as stick model in blue. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as light-blue stick models. In all cases, oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue and water molecules as small spheres. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

As a second probe we successfully soaked N-methylurea into PKA crystals. In the complex with N-methylurea we can find two probe molecules in the active site. The

first one binds very similarly to phenol addressing the hinge region (Figure 35a). It also interacts with Glu 121 and Val 123. The carbonyl group of N-methylurea acts as H-bond acceptor of the backbone NH of Leu 123 and one of its NH₂ groups is an H-bond donor to the carbonyl group of Glu 121. N-methylurea also places its methyl substituent towards a small binding niche which is flanked by five hydrophobic residues (Tyr 122, Phe 327, Leu 49, Ala 70 and Val 57) and which is left unoccupied in the phenol structure. The orientation is assisted by a hydrogen bond between the methyl substituted NH group and the carbonyl group of the second N-methylurea molecule. The orientation of the methyl group possibly indicates a putative hydrophobic site competent to accommodate hydrophobic portions of a prospective lead. The second N-methylurea molecule coincides with the position of the second phenol molecule in the above described complex by addressing the sugar pocket. The N-methylurea molecule forms also a hydrogen bond to Glu 127 with the methyl substituted NH₂ group. Besides, the second NH₂ group interacts via hydrogen bonds with the backbone carbonyl of Glu 170 and the side chain carbonyl of Asn 171. In addition to the previously mentioned interaction to the first N-methylurea molecule, the carbonyl moiety of the second N-methylurea molecule is also coordinated by a water molecule which is present in the active site (Figure 35b).

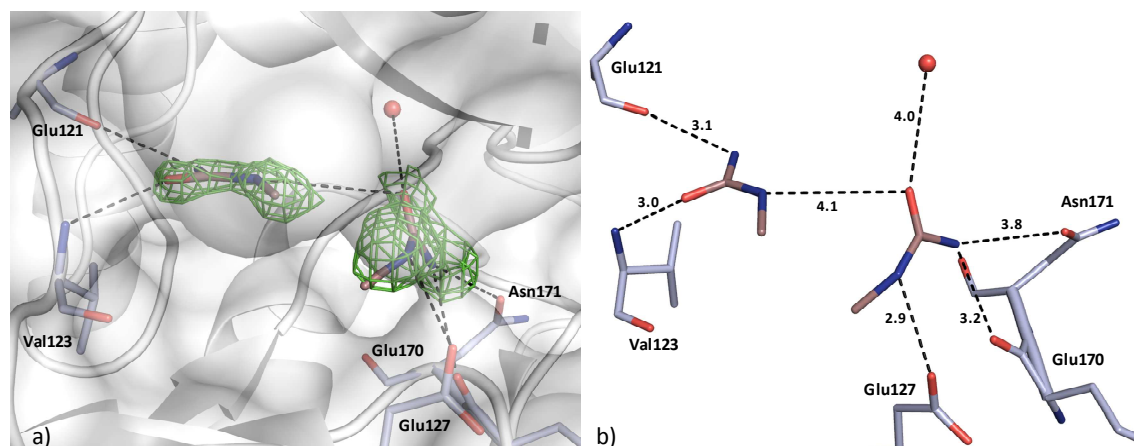


Figure 35: *a:* Surface representation of the active site of PKA. The solvent-accessible surface of the protein is shown in gray. Amino acids involved in interactions with N-methylurea (violet) are shown in light-blue stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. The electron density ($2F_o - F_c$) for the phenol molecule is shown in green at a level of 1.5σ . *b:* Close up view of the N-methylurea binding geometry in the PKA complex. N-methylurea is shown as stick model in violet. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as light-blue stick models. In all cases oxygen, atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue and water molecules as small spheres. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

D-xylose-isomerase (DXI): We were also able to detect one S-1,2-propanediol molecule in the active site of DXI (Figure 36a). With the hydroxyl group in position 2 it is coordinated to the catalytic manganese ion of the two manganese ions located in the active site of DXI. In addition, the hydroxyl group addresses also the carboxylate group of Glu 180 and interacts with a water molecule. The second hydroxyl group forms hydrogen bonds to one of the ring nitrogens of His 53 and also to an incorporated water molecule (Figure 36b).

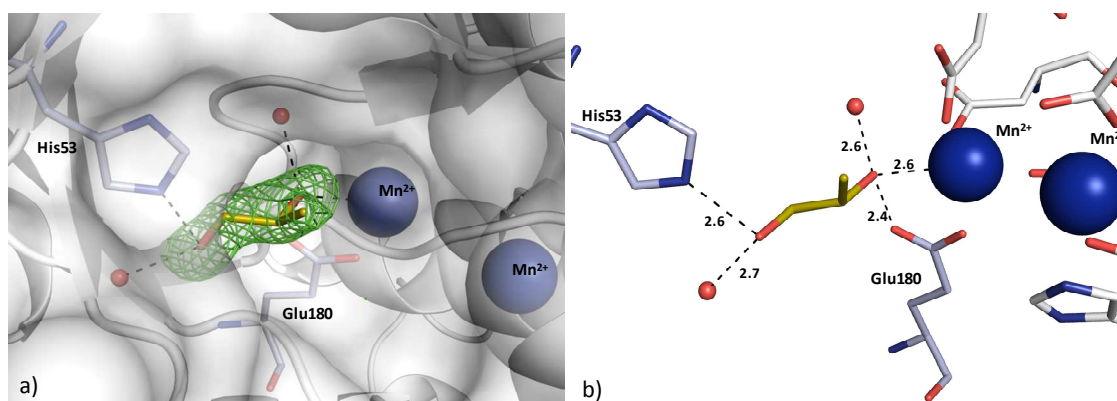


Figure 36: *a:* Surface representation of the active site of DXI. The solvent-accessible surface of DXI is shown in gray. Amino acids involved in interactions with S-1,2-propanediol (olive) are shown in light-blue stick models and the two manganese ions as blue spheres. In all cases oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. The electron density (2Fo-Fc) for the S-1,2-propanediol molecule is shown in green at a level of 2.0 σ . *b:* Close up view of the S-1,2-propanediol binding geometry in the DXI complex. S-1,2-propanediol is shown in olive as stick model. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as light-blue stick models for S-1,2-propanediol and as white stick models for the residues (Asp 286, Asp 244, Glu 216, Asp 254 and His 219) coordinating the two manganese ion). In all cases, oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue, the two manganese ions are shown as blue spheres and water molecules as small spheres. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase (IspD): Apart from TLN, we were able to detect one R-1,2-propanediol molecule in the active site of both monomers of IspD (Figure 37a). In IspD, both monomers feature one active site, which is composed by residues of each monomer. The binding motifs are similar in both monomers. Therefore, we will discuss only one of the 1,2-propanediol molecules binding in the active site of IspD. The first hydroxyl group of R-1,2-propanediol in IspD binds via hydrogen bonds to the backbone NH as well as to the side chain hydroxyl group of Thr A140 and the backbone carbonyl of Ala B163 in IspD. The second hydroxyl group also

interacts via an H-bond with the carboxylate group of Asp B106, the guanidinium group of Arg B109 and the side chain NH₂ of Lys B213 (Figure 37b).

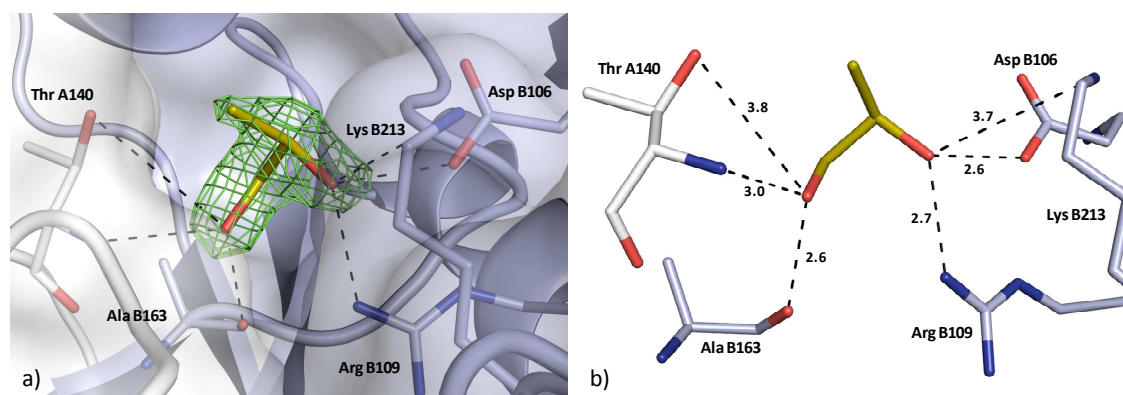


Figure 37: *a:* Surface representation of the active site of IspD. The solvent-accessible surface of monomer1 is shown in gray and for monomer2 in light-blue. Amino acids involved in interactions with R-1,2-propanediol (olive) are shown in light-blue stick models for monomer2 and in white stick models for monomer1. In all cases oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. The electron density (2Fo-Fc) for the R-1,2-propanediol molecule is shown in green at a level of 2.0 σ . *b:* Close up view of the R-1,2-propanediol binding geometry in the IspD complex. R-1,2-propanediol is shown in olive as stick model. The interacting side chains of amino-acid residues are displayed as light-blue stick models for monomer2 and as white stick models for monomer1. In all cases, oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

DrugScore hotspot calculations. As described above we found a set of molecular probes which commonly bind to different protein binding sites. Probe characterisation and the mean intensities in the binding pocket of the respective probes applied to the different enzymes are listed in Table 7. This approach of experimental binding site mapping can be used as starting point to construct a protein-based pharmacophore. Apart from the above described experimental approach, the most favourable binding regions in an active site, the so called *hotspots* of binding, can be predicted computationally by programs such as GRID (Goodford 1985), DrugScore (Gohlke, Hendlich et al. 2000) or SuperStar (Verdonk, Cole et al. 1999). In the present study we used DrugScore based on an *in house* derived atom typesetting, which mainly based on the SYBYL atom types (Tripos) to characterise the investigated molecular probes. Probe characterisations of the respective probes applied to the different enzymes are listed in Table 1. For visualisation purposes the contour level of carbon (black), oxygen (red) and nitrogen (blue) is shown as 60 % of the local minima in all pictures.

<p>Phenol: C.ar6 = sp2 carbon in an aromatic ring system; O.ph = phenolic hydroxyl group.</p> <p><u>TLN:</u> C.ar6: 9.26, O.ph: -51.17</p> <p><u>PKA:</u> Hinge phenol: C.ar6: 8.05, O.ph: 14.23; Sugar pocket: C.ar6: 7.94, O.ph: 2.52</p>
<p>Aniline: C.ar6 = sp2 carbon in a aromatic ring system; N.aap = primary aromatic amine.</p> <p><u>TLN:</u> C.ar6: 8.6; N.aap: 0.35</p>
<p>Urea: O.amp = oxygen in carbonamides; N.amp = carbonamide with one heavy atom bounded.</p> <p><u>TLN:</u> O.amp: 2.28; N.amp: 3.28</p>
<p>N-methylurea: O.amp = oxygen in carbonamides; N.amp = carbonamide with one heavy atom bounded</p> <p><u>TLN:</u> O.amp: 2.28, N.amp: 3.28.</p> <p><u>PKA:</u> Hinge region: O.amp: 10.01, N.amp: 9.65; Sugar pocket: O.amp: 2.44, N.amp: 3.68.</p>
<p>1,2-Propanediol: C.3p = sp3 carbon; O.3oh = hydroxyl group</p> <p><u>TLN:</u> C.3: 8.19, O.3oh: -2.73</p> <p><u>IspD:</u> C.3: 8.44, O.3oh: 2.02</p> <p><u>DXI:</u> C.3: 16.05, O.3oh: 5.45</p>

Table 7: Probe characterization and DrugScore contour levels to the respective protein. The listed values reflect the calculated HotSpots as a multiple of the mean intensity in the respective active site and probe.

Phenol/Aniline: Comparing the crystallographically determined binding poses of 3-bromo-phenol and aniline in TLN with the *in silico* prediction of *hotspots* of similar atom types (O.ph and N.amp for the phenolic OH, respectively NH₂ group and C.ar6 for the phenyl moiety) indicates that the *hotspots* calculated by DrugScore are in good agreement with the experimentally determined positions of the aromatic ring moiety in aniline and phenol as well as the amino functionality of aniline (Figure 38a, b). Only the calculated favourable site for a phenolic OH group differs slightly from the position found in the X-ray structure as DrugScore does not predict the observed and electrostatically favoured orientation towards the zinc ion. The DrugScore *hotspot* analysis of aromatic carbons and phenolic OH groups in PKA agrees well with the observed binding modes of the two phenols in the active side of the protein. Figure 38c

shows the *hotspot* contouring for C.ar (black) and O.ph (red) together with the experimentally determined binding mode.

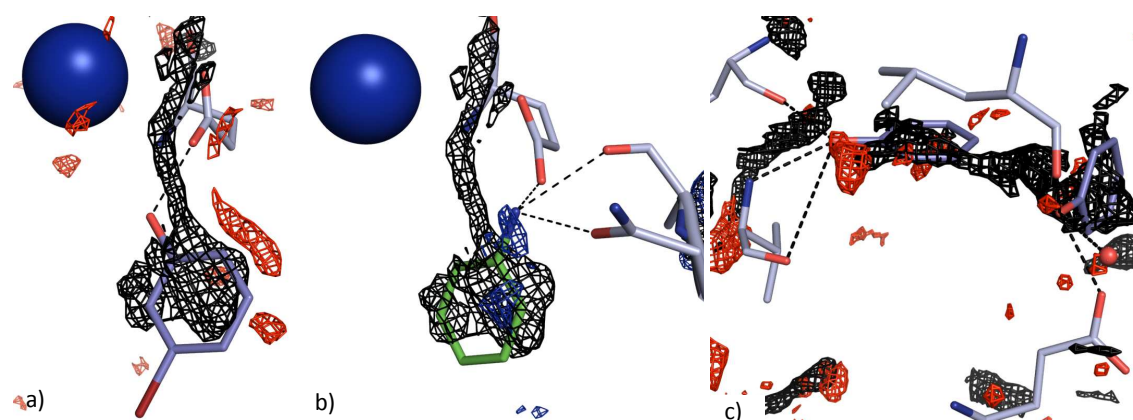


Figure 38: a: DrugScore HotSpot analysis of the TLN-3-bromo-phenol complex; 3-bromo-phenol is displayed in blue and Glu 143 as light-blue stick model and the catalytic zinc ion as sphere. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes C.ar6 (black) and O.ph (red) for phenol. b: DrugScore HotSpot analysis of the TLN-aniline complex; aniline is displayed in green and Glu 143, Ala 113 and Asn 112 as light-blue stick model and the catalytic zinc ion as sphere. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes C.ar6 (black) and N.aap (blue) for aniline. c: DrugScore HotSpot analysis of the PKA-phenol complex; phenol is displayed in blue and the interacting residues Glu 121, Val 123, Leu 49 and Glu 127 as light-blue stick model. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes C.ar6 (black) and O.ph (red) for phenol.

Urea/N-Methylurea: As described above one urea and one N-methylurea molecule bind to the S1'-pocket of TLN and two N-methylurea molecules were found in the active site of PKA. In both cases, the atom types amide nitrogen (N.amp; blue) and amide oxygen (O.am; red) were used as probes for the *in silico* DrugScore calculations. For N-methylurea, the position of the carbonyl and both amino functions are correctly predicted in TLN (Figure 39a). Unfortunately, only the position of the carbonyl group of urea agrees with the crystallographic determined binding in TLN (Figure 39b). For N-methylurea binding to PKA the molecule which is coordinated to the hinge region appears correctly in the DrugScore *hotspots* calculations. For the second N-methylurea molecule only the position of one amino functionality is predicted correctly (Figure 39c). This prediction is probably influenced by the fact that binding to the hinge region is more specific and likely energetically more favourable compared to the sugar pocket. However, for both enzymes the positions of the amino groups and the carbonyl oxygen

of at least one N-methylurea molecule are correctly predicted and coincide with the crystallographically determined binding positions.

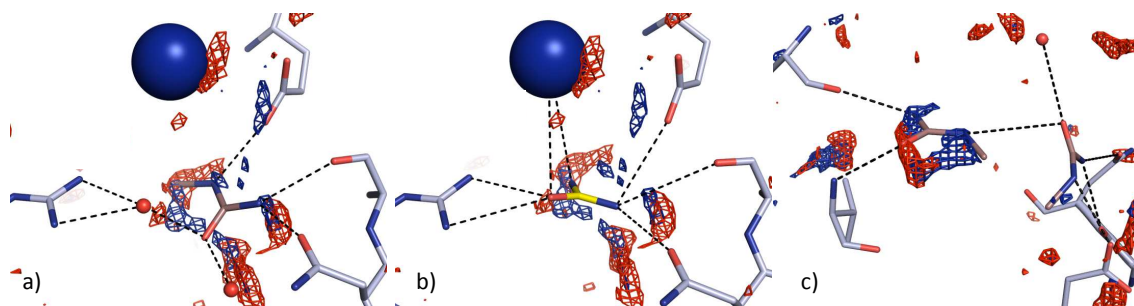


Figure 39: *a:* DrugScore^{HotSpot} analysis of the TLN-N-methylurea complex; N-methylurea (right) is displayed in violet, the interacting residues Glu 143, Ala 112, Asn 112 and Arg 203 as light-blue stick model and the catalytic zinc ion as blue sphere. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes N.amp (blue) and O.amp (red) for N-methylurea. *b:* DrugScore^{HotSpot} analysis of the TLN-urea complex; urea is displayed in yellow, the interacting residues Glu 143, Ala 112, Asn 112 and Arg 203 as light-blue stick model and the catalytic zinc ion as blue sphere. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes N.amp (blue) and O.amp (red) for urea. *c:* DrugScore^{HotSpot} analysis of the PKA-N-methylurea complex; N-methylurea is displayed in violet and the interacting residues Glu 121, Val 123, Glu 127, Glu 170 and Asn 171 as light-blue stick model. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes N.amp (blue) and O.amp (red) for N-methylurea.

1,2-Propanediol: In the case of 1,2-propanediol as probe molecule for soaking, maps were calculated for aliphatic carbon (C3p; black) and for the terminal hydroxyl group (O.3oh; red). As indicated in Figure 40a – c, in all cases the predicted favourable region for an aliphatic carbon (black) agrees with the experimentally observed poses and at least some of the determined hydroxyl group positions (red) match with favourable contour areas.

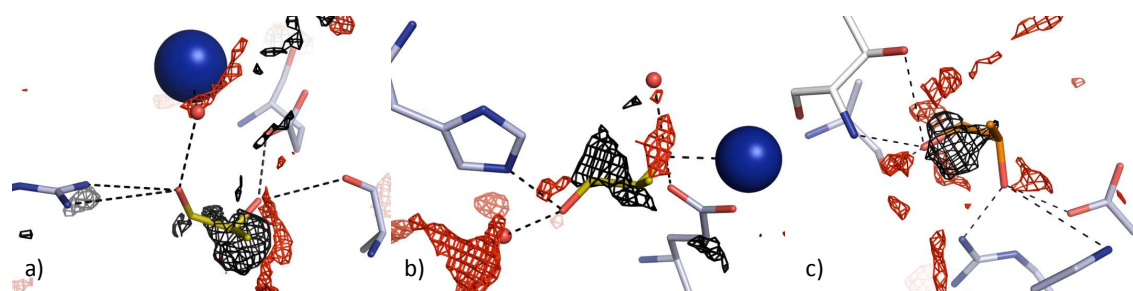


Figure 40: *a:* DrugScore^{HotSpot} analysis of the TLN-S-1,2-propanediol complex; S-1,2-propanediol and Glu 143, Ala 112 and Arg 203 as light-blue stick model and the catalytic zinc ion as sphere. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes C.3p (black) and O.3oh (red) for S-1,2-propanediol. *b:* DrugScore^{HotSpot} analysis of the DXI-S-1,2-propanediol complex; S-1,2-propanediol is displayed in olive and His 54 and Glu 180 as light-blue stick model and the catalytic manganese ion as sphere. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes C.3p (black) and O.3oh (red) for S-1,2-propanediol. *c:* DrugScore^{HotSpot} analysis of the IspD-R-1,2-propanediol complex; R-1,2-propanediol is displayed in olive and the interacting residues Thr A140, Ala B163, Arg B109, Asp B106 and Lys B213 as light-blue stick model. In all cases oxygen atoms are depicted in red, nitrogen atoms in blue. Hotspots were calculated using the respective probes C.3p (black) and O.3oh (red) for R-1,2-propanediol.

Superposition with larger ligands in related crystal structures. Finally, we compared the observed positions of the utilized probe molecules in TLN, PKA, DXI and IspD with related molecular parts found as components in larger ligands crystallised with the respective proteins. We elucidated whether position and orientation of the found fragments match with functionalities embedded into larger scaffolds. The ligands which were used are listed in Table 8.

Abbreviation	Structure
Val-Lys (TLN)	

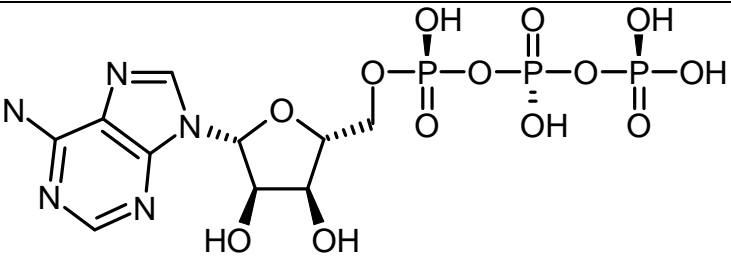
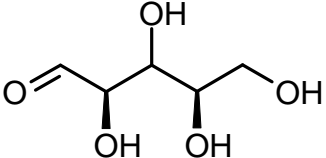
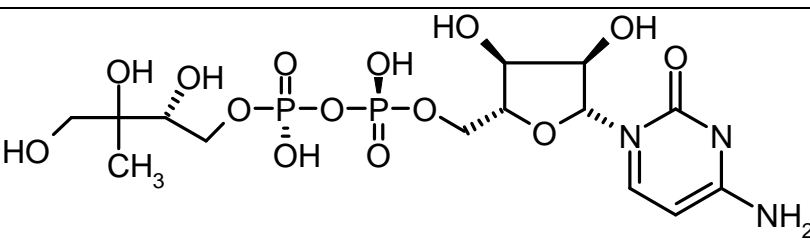
ATP (PKA)	
D-Xylose (DXI)	
CDPME (IspD)	

Table 8: Schematic structure of reference ligands

Thermolysin: We superimposed the structures of the discovered probe molecules aniline, N-methylurea and 1,2-propanediol in complex with TLN with the dipeptide Val-Lys (PDB code 8TLN) (Holland, Tronrud et al. 1992). The aromatic ring system of aniline and the hydrophobic Val side chain are located at similar position in the hydrophobic S1' pocket of TLN. This orientation of hydrophobic parts is observed quite often in TLN inhibitors. More interestingly, the binding patterns of the N-terminal NH₂ group of the Val side chain (light-blue) as well as for aniline (green) and N-methylurea (violet) are similar to each other and deviate only by 1.11 Å. They all exhibit the same orientation and form hydrogen bonds to Glu 143, Ala 113 and Asn 112 (Figure 41a). Moreover, the position of the first hydroxyl group of 1,2-propanediol is close to the carbonyl of the Val side chain. Both are forming H-bonds to the guanidinium functionality of Arg 203, while the second hydroxyl group is binding to Glu 143 and Ala 113 as described for the Val side chain NH₂ (Figure 41b).

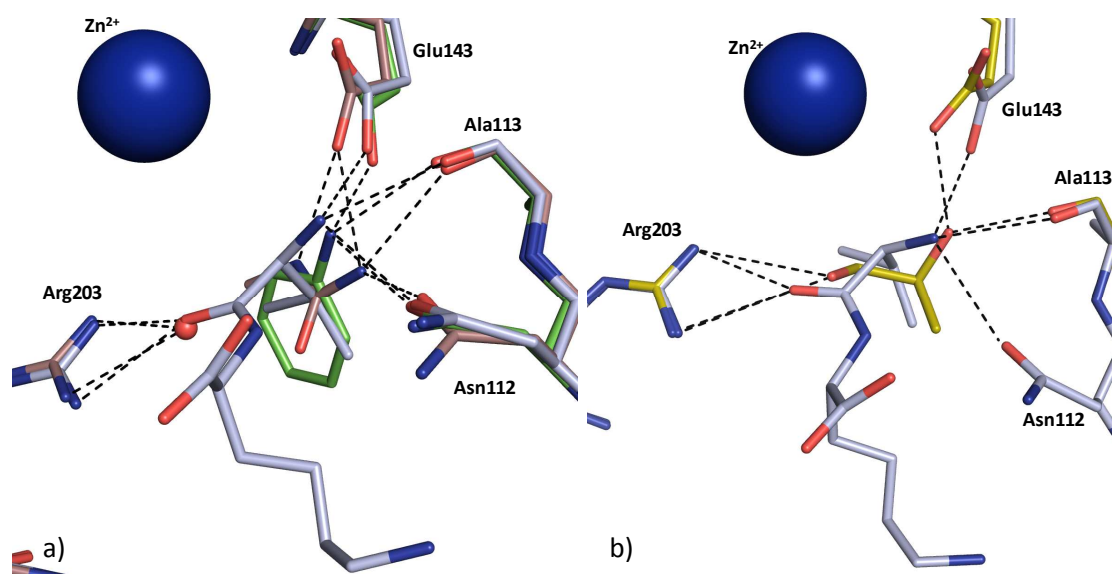


Figure 41: Superposition of a: aniline (green) and N-methylurea (violet) and b: S-1,2-propanediol (olive) with Val-Lys (light-blue). Aniline, N-methylurea, S-1,2-propanediol as well as the side chain amino-acid residues are displayed as stick models. In all cases, oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

Protein Kinase A: In the case of the PKA structure two phenol and two N-methylurea molecules, respectively were detected in the active site. To compare the fragment structures with the substrate ATP we selected the corresponding complex (PDB code 1ATP) (Zheng, Trafny et al. 1993).

By comparing ATP (light-blue) with the PKA-phenol complex it appears that the hydroxyl group of the phenol molecule (blue) addressing the hinge region is similarly located as the N1 in the purine moiety (Figure 42a-b). The phenyl portion of phenol also matches the hydrophobic centre of the purine ring system.

By comparing the complexes of N-methylurea (violet) with the ligand ATP it is noticeable that this molecule shows the same hydrogen bonding pattern as the adenosine base and phenol towards the hinge region (Figure 42a). One amide group of N-methylurea binds with the same orientation to Val 123 and Glu 121 as the exocyclic 6-NH₂ group of the purine moiety. The carbonyl group of N-methylurea matches with N1 of the purine heterocycle forming hydrogen bonds to the hinge residue Val 123.

The position of the respectively second phenol and N-methylurea molecule is covered by the sugar moiety of ATP (Figure 42b). The hydroxyl group in position 2 of the five membered sugar ring and of phenol as well as the NH group of N-methylurea form a hydrogen bond to Glu 127. Additionally these hydroxyl functionalities interact also with one water molecule which is present in the sugar pocket.

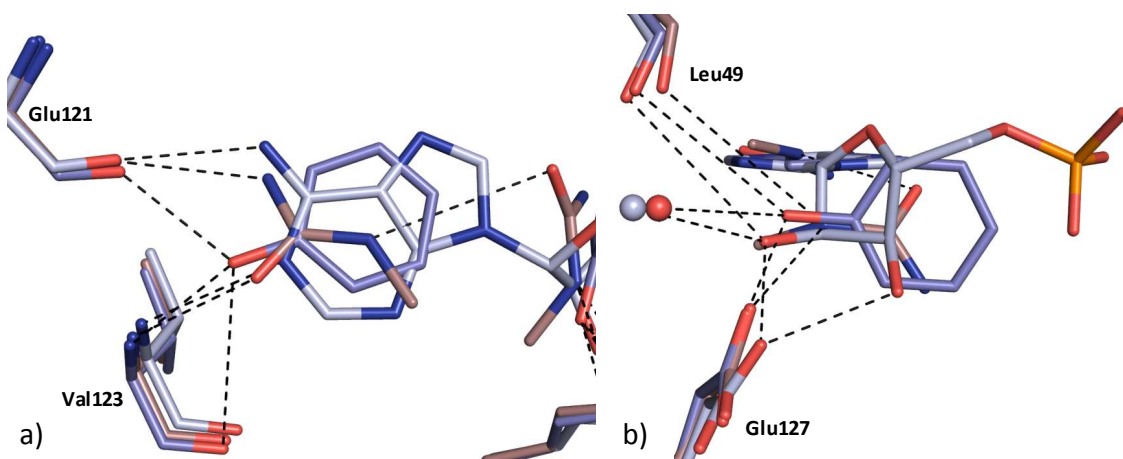


Figure 42: Superposition of a: phenol (blue), N-methylurea (violet) and ATP (light-blue) at the hinge region and b: in the sugar pocket of PKA. ATP, phenol and N-methylurea as well as the side chain amino-acid residues are displayed as stick models. In all cases, oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase and D-xylose-isomerase: Both, in DXI and IspD 1,2-propanediol molecules were detected. The complexes of DXI and IspD bound to their substrates were compared to our propandiol complexes. In case of DXI, the structure containing the open-chain form of D-xylose (PDB code: 1XIC) (Carrell, Hoier et al. 1994) is superimposed with our S-1,2-propanediol complex. The position of both OH groups of the latter matches perfectly well in position and orientation with the first and third hydroxyl group of the open-chain D-xylose (Figure 43a). They show very similar binding patterns. The first OH group of S-1,2-propanediol (olive) and D-xylose (light-blue) form hydrogen bonds to His 53 and one water molecule. The second OH group of the probe molecule and third OH group of D-xylose built up a hydrogen network to Glu 180 and an additional water molecule mediates a contact to one of the catalytic manganese ions in the active site.

For IspD the R-1,2-propanediol complex was compared with the structure of the substrate CDP-methylerythritol (PDB code 1INI) that is bound to the enzyme's catalytic site (Richard, Bowman et al. 2001). The R-1,2-propanediol molecule (olive) matches perfectly well with the terminus of methylerythritol (light-blue) (Figure 43b). Both hydroxyl functionalities and even the methyl group coincide and both hydroxyl groups form hydrogen bonds to the carboxylate of Asp B106, one guanidinium NH of Arg B109, the backbone carbonyl of Ala B136, the terminal NH₂ of Lys B213 and the backbone NH of Thr A140.

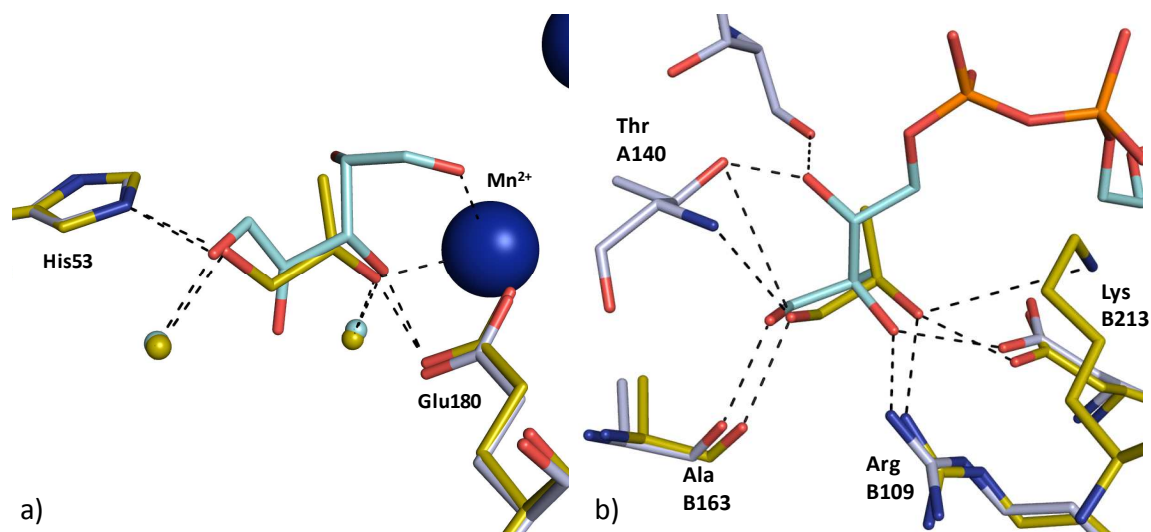


Figure 43: *a:* Superposition of S-1,2-propanediol (olive) and the linear form of D-xylose (light-blue) in the active site of DXI. Both the linear form of D-xylose and S-1,2-propanediol as well as the side chain amino-acid residues are displayed as stick models. In all cases oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner. *b:* Superposition of R-1,2-propanediol (olive) and CDPME (light-blue) in the active site of IspD. Both CDPME and R-1,2-propanediol as well as the side chain amino-acid residues are displayed as stick models. In all cases, oxygen atoms are depicted in red and nitrogen atoms in blue. Dashes symbolize the interaction between one molecule and the respective partner.

5.4 Conclusion

In this study we demonstrate that different highly soluble, small molecular probes with molecular weight much lower than standard fragments can bind to proteins originating from different classes: for TLN, PKA, DXI and IspD complexes with phenol, aniline, urea, N-methylurea and 1,2-propanediol could be determined. Furthermore, we could evidence that the positions of the functional groups and ring systems of these molecules are well in agreement with most *in silico hotspot* predictions calculated by the program

DrugScore. The relevance of the observed probe molecule poses for drug binding could be confirmed by superimposing much larger ligands for which complex crystal structures have been determined. We were able to match not only the position of the functional groups by our molecular probes but also parts of the scaffold of the larger ligands. The fact that small molecular probes can still be discovered as kind of original seeds from which an entire inhibitor can be grown opens a very promising prospective to use the binding of such small probes as a starting point of a fragment-like de novo design.

We believe that molecular probes such as phenol, aniline, urea, N-methylurea and 1,2-propanediol are suitable to be applied rather general to many proteins to perform an experimental binding site mapping particularly if they are used in parallel and are further supported by computer tools such as DrugScore to fully map the binding pocket for a subsequent inhibitor design.

5.5 Weitere Ergebnisse

Im Zuge des *active site mapping* wurde zum einen versucht, die gefundenen Sondenmoleküle auf zusätzliche, in unserer Arbeitsgruppe vorhandene Proteinsysteme, deren Expression und Kristallisation etabliert sind, zu übertragen, und zum anderen, weitere geeignete Fragmente zu finden. Diese Vorhaben waren leider nicht immer erfolgreich, sollen aber an dieser Stelle erwähnt werden.

5.5.1 Weitere Proteinsysteme

Nachdem die Moleküle Phenol, Anilin, Harnstoff, N-Methylharnstoff und 1,2-Propanediol erfolgreich in der Bindetasche von TLN ausfindig gemacht werden konnten, wurde versucht, diese Sonden auf folgende Proteine zu übertragen: CDPME-Synthetase (IspD), Ectoin-Hydroxylase (EctD), β -Alanin-CoA-Ammoniak-Lyase (ACL), *Torpedo californica* Acetylcholinesterase (AChE) und tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT). Aufgereinigte AChE aus dem elektrischen Organ des Fisches *Torpedo californica* wurde freundlicherweise von der Gruppe um Prof. J. Sussman und

Prof I. Silman, Rehovot, Israel, zur Verfügung gestellt. Kristalle von EctD und ACL wurden freundlicherweise von Prof. Dr. K. Reuter sowie Kristalle von TGT wurden von Dr. Tina Ritschel bzw. Florian Immekus zur Verfügung gestellt. Es wurde versucht, die Fragmente wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben, in die Bindetasche der jeweiligen Enzyme eindiffundieren zu lassen. Im Anschluss wurden die Kristalle gemäß Kapitel 4.1.2.3 vermessen.

5.5.2 Kristallisation von ACL, AChE, EctD, und TGT

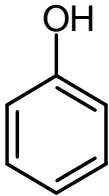
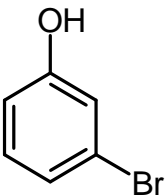
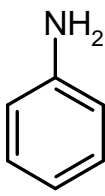
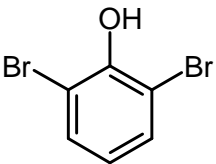
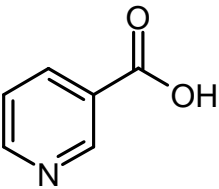
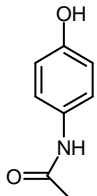
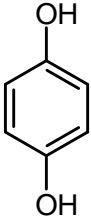
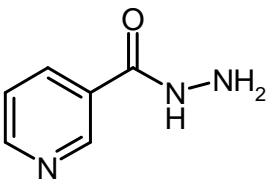
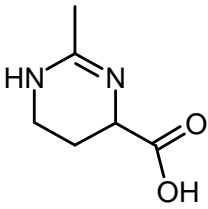
Zur Kristallisation wurde ACL aus dem Organismus *C. propionicum* isoliert und aufgereinigt (Herrmann, Selmer et al. 2005). Das gereinigte Protein wurde im Anschluss mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 mit einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst. ACL-Kristalle wurden durch die Dampfdiffusion-Methode bei 18 °C mit sitzenden Tropfen gezüchtet. Hierbei wurde 3 µl Proteinlösung mit 3 µl Reservoirlösung (10 % PEG MME550, 0.1 MES pH 6.0, 0.05 ZnSO₄) vermischt. Bevor ACL-Kristalle zu Datensammlungszwecken genutzt werden konnten, mussten sie in einen Stabilitätspuffer mit ansteigender MPD-Konzentration (15 – 20 % PEG MME 550; 0,1 M MES pH 6.0, 0.05 M ZnSO₄) überführt werden. Die finale MPD-Konzentration von 20 % reichte somit auch als Gefrierschutz zur Tieftemperatur Datensammlung aus.

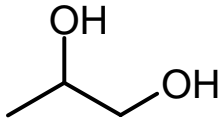
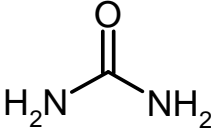
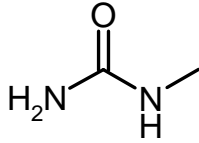
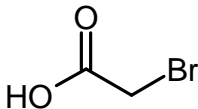
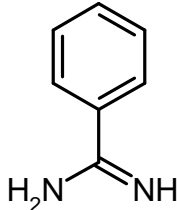
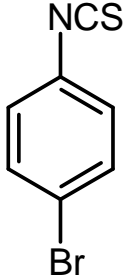
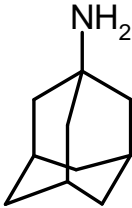
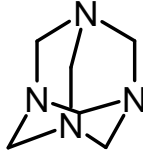
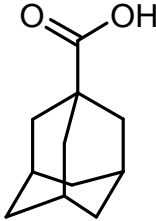
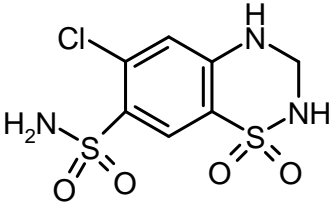
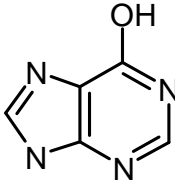
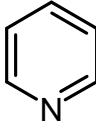
Das Protein EctD-*Strep*-tag-II wurde in *E. coli* überexprimiert, aufgereinigt und zu einer finalen Konzentration von 10 mg/ml mit dem Puffer 10 mM TES, pH 7.5, 80 mM NaCl und 2 mM DTT verdünnt. EctD-*Strep*-tag-II-Kristalle wurden ebenfalls durch die Dampfdiffusion-Methode bei 18 °C mit sitzenden Tropfen erzeugt. Es wurde 2 µl EctD-*Strep*-tag-II mit 3 µl Reservoirlösung (1.0 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M NaF, 2 mM TCEP, 0.02% Natriumazid und 0.1 M Natriumacetat pH 5.0) vermischt. Als Gefrierschutz zu Datensammlungszwecken wurden EctD-*Strep*-tag-II-Kristalle in einen Puffer bestehend aus Reservoirlösung mit erhöhter (NH₄)₂SO₄ Konzentration von 1.4 M und 30 % Glycerin überführt.

Die Kristallisation von AChE und TGT wurde bereits im Kapitel 3.2.1 bzw. 3.5.1 beschrieben.

5.5.3 Verwendete Sondenmoleküle

Im Zuge des „*active site mapping*“ wurden folgende Moleküle (Tabelle 9) durchgemustert. Alle Fragmente wurden an dem Protein TLN getestet und anschließend durch Röntgenstrukturanalyse vermessen und ausgewertet. Es wurde versucht durch Soaking die Liganden in einer Konzentration von 12,5 bis 100 mM in die Bindetasche von TLN einzubringen. Alle Fragmente wurden mit 0 – 100 % DMSO gelöst und mit dem Puffer 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Im Falle der Gase Schwefelhexafluorid und Distickstoffmonoxid wurden die Proteinkristalle von TLN, TGT und DXI einem Gasdruck von 300 PSI für 2 – 10 min ausgesetzt.

<p><u>Phenol</u></p>  <p>Molekulargewicht: 94.11 LogP: 1.482</p>	<p><u>3-Bromphenol</u></p>  <p>Molekulargewicht: 184.00 LogP: 2.63</p>	<p><u>Anilin</u></p>  <p>Molekulargewicht: 93.13 LogP: 0.936</p>
<p><u>2,6-Dibromphenol</u></p>  <p>Molekulargewicht: 251.93 LogP: 3.412</p>	<p><u>Nicotinsäure</u></p>  <p>Molekulargewicht: 123.11 LogP: 0.147</p>	<p><u>Paracetamol</u></p>  <p>Molekulargewicht: 151.16 LogP: 0.339</p>
<p><u>Hydrochinon</u></p>  <p>Molekulargewicht: 110.11 LogP: 0.644</p>	<p><u>Isoniazid</u></p>  <p>Molekulargewicht: 137.14 LogP: -1.246</p>	<p><u>Ectoin</u></p>  <p>Molekulargewicht: 142.16 LogP: 0.272</p>

<p><u>Propandiol</u></p>  <p>Molekulargewicht: 76.09 LogP: -1.341</p>	<p><u>Harnstoff</u></p>  <p>Molekulargewicht: 60.06 LogP: -2.110</p>	<p><u>N-Methylharnstoff</u></p>  <p>Molekulargewicht: 74.08 LogP: -1.228</p>
<p><u>2-Bromessigsäure</u></p>  <p>Molekulargewicht: 138.95 LogP: 0.507</p>	<p><u>Benzamidin</u></p>  <p>Molekulargewicht: 112.15 LogP: 0.650</p>	<p><u>4-Bromphenylisothiocyanat</u></p>  <p>Molekulargewicht: 214.08 LogP: 4.031</p>
<p><u>Amantadin</u></p>  <p>Molekulargewicht: 187.72 LogP: 2.22</p>	<p><u>Hexamethylenetetramin (Urotropin)</u></p>  <p>Molekulargewicht: 140.19 LogP: 2.17</p>	<p><u>Adamantancarbonsäure</u></p>  <p>Molekulargewicht: 180.25 LogP: 2.597</p>
<p><u>Hydrochlorothiazid</u></p>  <p>Molekulargewicht: 297.74 LogP: 0.071</p>	<p><u>Allopurinol</u></p>  <p>Molekulargewicht: 136.11 LogP: -1.332</p>	<p><u>Pyridin</u></p>  <p>Molekulargewicht: 79.12 LogP: 0.726</p>

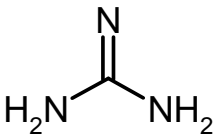
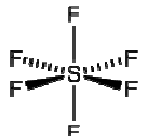
<u>Guanidin</u>	<u>Distickstoffmonoxid (Lachgas)</u>	<u>Schwefelhexafluorid</u>
	$\text{N}^-=\text{N}^+=\text{O}$	
Molekulargewicht: 59.08 LogP: -1.83	Molekulargewicht: 44.01 LogP: 0.43	Molekulargewicht: 146.1 LogP: k.A.

Tabelle 9: Auflistung aller verwendeter Moleküle im Zuge des "active site mappings". Neben den Strukturformeln ist das jeweilige Molekulargewicht und der logP-Wert angegeben.

5.5.4 Datensammlung von TLN in Komplex mit 2-Bromessigsäure und N₂O

Vor der Derivatisierung (siehe hierzu Kapitel 3.2.2) mit Distickstoffmonoxid sowie nach dem Soaking mit 50 mM 2-Bromessigsäure wurden die jeweiligen TLN-Kristalle für ca. 10 s in einen Puffer aus 30 % Glycerin und 100 mM Tris/HCl von pH 7.5 transferiert. Der Datensatz des Komplexes von TLN mit 2-Bromessigsäure wurde bei tiefer Temperatur (100 K) an der hauseigenen Röntgenanlage (Rigaku RU-H3R mit rotierender Kupferanode (50 kV; 90 mA), fokussierenden Spiegeln (Xenocs mirrors) und einem R-Axis IV image-plate Detektorsystem) aufgenommen. Der Datensatz von TLN in Komplex mit N₂O Datensatz wurde am Synchrotron BESSY II, (Berlin) an der Beamline 14.2 aufgenommen. Datenprozessierung und Skalierung wurden mit dem Programmpaket HKL2000 (Otwinowski and Minor 1997) durchgeführt. Details zu den Datensammlungsstatistiken sind in Tabelle 10 aufgeführt.

<i>Datensatz</i>	<i>TLN-Bromessigsäure</i>	<i>TLN-N₂O</i>
PDB code:	3NN7	k.A.
Datensammlung und -Prozessierung		
λ [Å]	1.5418	0.91847
Raumgruppe	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22
Einheitszelle		
a [Å]	92.9	93.1
b [Å]	92.9	93.1
c [Å]	129.9	130.3

Experimental Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery

Diffraaktionsdaten		
Auflösung [\AA]	25.0 – 2.05 (2.09 – 2.05) ^[a]	25.0 – 1.42 (1.45 – 1.42) ^[a]
Anzahl unabhängiger Reflexe	20506 (971) ^[a]	65886 (3215) ^[a]
R_{sym} [%] ^[b]	8.1 (49.7) ^[a]	7.7 (48.0) ^[a]
Vollständigkeit	95.6 (94.4) ^[a]	100.0 (100.0) ^[a]
Redundanz	4.9 (4.2) ^[a]	9.2 (9.1) ^[a]
I/σ	18.3 (3.1) ^[a]	24.7 (3.7) ^[a]
Verfeinerung		
Programm	Shelx	Shelx
Auflösungsbereich	10 – 2.05	10 – 1.42
Anzahl der Reflexe benutzt in der Verfeinerung	19520	63765
Finale R-Werte		
$R_{\text{free}}(F_o; F_o > 4\sigma)^{[c]}$	27.3; 25.4	k.A.
$R_{\text{work}}(F_o; F_o > 4\sigma)^{[d]}$	18.7; 17.3	k.A.
Anzahl an Atomen (keine Wasserstoffatome)		
Protein	2408	k.A.
Wassermoleküle	162	k.A.
Ionen und andere Atome (keine Wasserstoffatome)	10	k.A.
Ramachandran plot ^[e]		
Bevorzugte Bereiche (%)	86.7	k.A.
Erlaubte Bereiche (%)	13.0	k.A.
Zusätzlich erlaubte Bereiche (%)	0	k.A.
Nicht erlaubte Bereiche (%)	0.4	k.A.
σ B-Faktoren (\AA^2)		
Proteinatome	23.5	k.A.
Ligand	25.3	k.A.
Wassermoleküle	31.5	k.A.
RMSD Bindungslängen [\AA]	0.005	k.A.
RMSD Bindungswinkel	2.2	k.A.

^aWerte wurden prozessiert mit HKL2000; ^bWerte in den Klammern beziehen sich auf den höchsten Auflösungsbereich;

^c $R_{\text{sym}} = \sum |I - \bar{I}| / \sum I$

Tabelle 10: Datensammlungsstatistiken zu TLN in Komplex mit 2-Bromessigsäure und N_2O

5.5.5 Ergebnisse und Diskussion

Alle Fragmente und Gase, die in Tabelle 9 aufgelistet sind, wurden am Enzym TLN röntgenkristallographisch durchgemustert. Erfolgreich konnten hier die Moleküle 1,2-Propandiol, 3-Bromphenol, Anilin, Harnstoff und N-Methylharnstoff in der Bindetasche von TLN nachgewiesen werden. Die jeweiligen Ergebnisse und Strukturen zu diesen TLN-Komplexen sind im Kapitel 4.2 beschrieben.

Zusätzlich zu den im Kapitel 4.2 beschriebenen Protein-Fragment-Komplexen, konnten TLN sowohl im Komplex mit 2-Bromessigsäure als auch im Komplex mit dem Gas Distickstoffmonoxid bestimmt werden. Die Symmetrie des Fragmentes N_2O erlaubt keine eindeutige Detektierbarkeit des kleinen Moleküls in der Elektronendichte. 2-Bromessigsäure ist aufgrund des elektronenziehenden Effektes des endständigen Broms sehr sauer. Diese Tatsache ließ eine für die Bindung nötige hohe 2-Bromessigsäurekonzentration nicht zu, ohne die Kristalle zu sehr in Mitleidenschaft zu ziehen.

Aufgrund der Tatsache, dass Distickstoffmonoxid ein sehr kleines, stäbchenförmiges Molekül ist, benötigt man zur Charakterisierung hoch aufgelöste Datensätze, und selbst dann ist die Struktur eines N_2O -Moleküls von der eines fehlgeordneten Wassermoleküls in der Elektronendichte nur schwer zu unterscheiden. Dazu kommt weiterhin die nahezu unmögliche Zuweisung des Stickstoff- bzw. Sauerstoffendes des N_2O -Moleküls in der Elektronendichte aufgrund der geringen Elektronendifferenz des Sauerstoffatoms (8e) zum Stickstoffatom (7e). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde Lachgas als Sondenmolekül zur Bindetaschencharakterisierung vorerst nicht weiter verfolgt. In Zukunft sollte, falls hochauflösende Proteinkristalle vorhanden sind, N_2O als Sondenmolekül aufgrund der einfachen Handhabung berücksichtigt werden.

2-Bromessigsäure bindet wie alle anderen im Kapitel 4.2 beschriebenen Fragmente in der $\text{S1}^{\text{'}}$ -Tasche von TLN. Es bildet ein Wasserstoffbrückennetzwerk zu den Aminosäuren Arg 203, Glu 143 und Ala 112 aus. Zusätzlich wird die 2-Bromessigsäure noch von zwei Wassermolekülen flankiert, wobei eines der beiden Wasser an der Koordination des katalytischen Zinkions beteiligt ist (Abbildung 44).

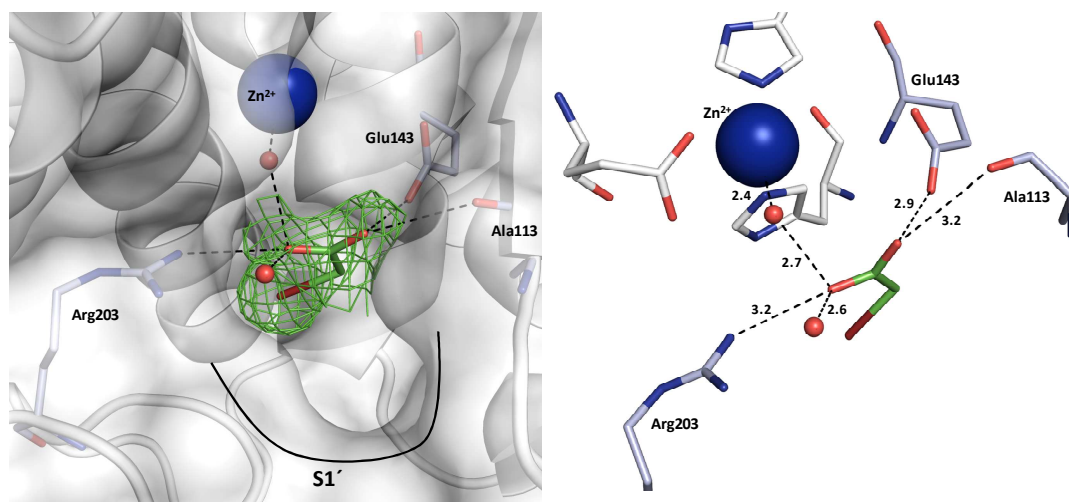


Abbildung 44: Links: Oberflächenpräsentation der S1'-Bindetasche von TLN im Komplex mit 2-Bromessigsäure. Die Lösungsmittel zugängliche Oberfläche ist in grau dargestellt. 2-Bromessigsäure (grün) und die an dessen Bindung beteiligten Aminosäuren (hellblau) sind im „stick-model“ dargestellt. Zusätzlich sind die möglichen Wechselwirkungen zu dem jeweiligen Partner durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Elektronendichte (2Fo-Fc) für 2-Bromessigsäure ist als grünes Gitter bei einer Stärke von 2.0 σ gezeigt. Rechts: Detailansicht des Bindemodus von 2-Bromessigsäure in der S1'-Tasche von TLN. Die an der Koordination des Zinkions beteiligten Aminosäuren (Glu 166, His 146 und His 142) sind weiß im „stick-model“ repräsentiert. In beiden Bildern sind die Sauerstoffatome rot und die Stickstoffatome blau dargestellt.

Durch Röntgen-Kristallstrukturbestimmung konnten 3 Lachgasmoleküle im Komplex mit TLN bestimmt werden. Allerdings bindet nur 1 Molekül im aktiven Zentrum von TLN. Im Gegensatz zu den Bindungsmodi der gefundenen Fragmente bindet das N₂O-Molekül über Wasserstoffbrücken zu Asp 150, Asn 165 und His 146 sowie zu zwei flankierende Wassermoleküle in der S1-Subtasche. Interessant ist hierbei auch zu erwähnen, dass ein Lachgasmolekül in der Xenonbindetasche im Proteininneren von TLN bindet. Ein weiteres Molekül bindet an der Oberfläche von TLN (Abbildung 45).

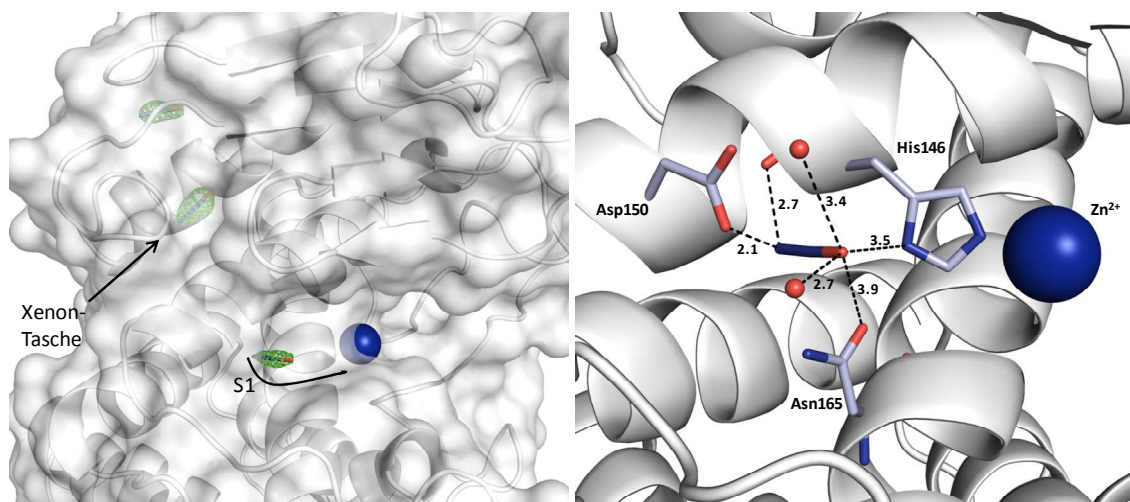


Abbildung 45: Links: Oberflächenpräsentation der Position der gebundenen N₂O-Moleküle in Komplex mit TLN. Die Lösungsmittel zugängliche Oberfläche ist in grau dargestellt. N₂O-Moleküle (blau/rot) sind als „stick-model“ dargestellt. Die Elektronendichte (2Fo-Fc) für alle N₂O-Moleküle ist als grünes Gitter bei einer Stärke von 2.0 σ gezeigt. Rechts: Detailansicht des Bindemodus eines N₂O-Moleküls in der S1-Subtasche von TLN. Die möglichen Wechselwirkungen zu dem jeweiligen Partner sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die an der Bindung des N₂O-Moleküls beteiligten Aminosäuren sind hellblau als „stick-model“ repräsentiert. In beiden Bildern sind die Sauerstoffatome rot, die Stickstoffatome blau und das katalytische Zinkion blau dargestellt.

Alle anderen in Tabelle 9 aufgelisteten Fragmente konnten bisher nicht röntgenkristallographisch im Komplex mit TLN bestimmt werden.

Die bei der Durchmusterung an TLN erfolgreich bestimmten Fragmente 1,2-Propandiol, 2-Bromessigsäure, 3-Bromphenol, Anilin, Harnstoff, N-Methylharnstoff und Phenol wurden auf andere Proteinsysteme übertragen. Erfolgreich konnten hier 1,2-Propandiol in IspD und DXI, sowie Phenol und N-Methylharnstoff in PKA durch Soaking in die jeweilige Bindetasche eingebracht und deren Bindungsmodi über Röntgenstrukturanalyse charakterisiert werden (siehe Kapitel 4.2). Nach Auswertung der entsprechenden Datensätze gemäß Kapitel 4.1.1.3 konnte aber keines der an TLN, DXI, IspD und PKA erfolgreich getesteten Fragmente in der Bindetasche von EctD, ACL, TGT und AChE erkannt werden. Ein Grund hierfür ist sicherlich die sehr schwache Bindungsaffinität der einzelnen Moleküle zu den jeweiligen Proteinsystemen. Um dennoch die oben beschriebenen Fragmente in die Bindetasche der Enzyme einzubringen, sind sehr hohe Ligandkonzentrationen nötig, bei denen die

Proteinkristalle kaum ausreichend lange stabil bleiben. Im Falle von AChE konnten in der Bindetasche aus der Kristallisation stammende PEG-Bruchstücke ausfindig gemacht werden. Aufgrund der höheren Konzentration an PEG 4000 in der Kristallisationslösung müsste ein bindendes Fragment schon sehr affin sein, um die PEG-Bruchstücke aus der Bindetasche zu verdrängen. Im Falle von Distickstoffmonoxid sind sehr hohe, besser noch ultrahoch aufgelöste Datensätze nötig, um ein Molekül in der Elektronendichte zu erkennen. Aufgrund der Tatsache, dass in TLN ein N₂O-Molekül in der Xenonkavität bindet, wäre es interessant zu sehen, ob Distickstoffmonoxid auch Komplexe mit den anderen Proteinsystemen eingeht, in denen Xenon gebunden hat (siehe Kapitel 3). Im Falle von TGT, EP und Sap2 wäre die Streuqualität der jeweiligen Kristalle auch hoch genug, um am Synchrotron hoch aufgelöste Datensätze aufzunehmen.

Co-Kristallisation wäre eine alternative Möglichkeit, um Fragmente in die Bindetasche von Proteinen einzubringen. Jedoch bleibt zu klären, ob das jeweilige Enzym bei der nötig hohen Ligandkonzentration noch kristallisiert.

6 Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen gegen Malaria und Tuberkulose - Expression, Reinigung und Kristallisation der CDPME-Synthetase

6.1 Einleitung

Die Familie der Isoprenoide umfasst über 30000 biologisch relevante Substanzen, die eine Vielzahl von Funktionen in Bakterien, Pflanzen, Insekten und Tieren erfüllen (Eisenreich, Schwarz et al. 1998). Zu dieser Familie gehören Cholesterol, welches als Zellmembranbaustein und als Vorstufe der Steroidhormonsynthese dient, sowie die fettlöslichen Vitamine A, D, E, und K (Rohmer 1999). Isoprenoide sind sowohl für das Überleben von prokaryontischen als auch von eukaryontischen Organismen essentiell. Als Grundbausteine für die Isoprenoidsynthese dienen Isopentenylidiphosphat (IPP) und das isomere Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Die Synthese von IPP erfolgt über zwei alternative Stoffwechselwege. Der Mevalonat-Weg, lokalisiert im Cytosol von fast allen Eukaryonten und im Cytoplasma vieler Prokaryonten, wurde lange Zeit als einziger Biosyntheseweg für Isoprenoide angesehen. Erst 1993 entdeckten Rohmer und Kollegen (Rohmer, Knani et al. 1993) einen Mevalonat unabhängigen Biosyntheseweg für IPP in Bakterien und Pflanzen. Dieser nicht-Mevalonat-Isoprenoid-Syntheseweg wird heute nach seinem ersten spezifischen Intermediat als 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphatweg (MEP-Weg) bezeichnet. Außerdem ist die Bezeichnung 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Stoffwechselweg (DOXP-Weg) geläufig.

In Pflanzen existieren der MEP- und der Mevalonat-abhängige Isoprenoidsyntheseweg parallel, und Stoffwechselintermediate können ausgetauscht werden (Eisenreich, Bacher et al. 2004). Der MEP-Weg ist in den Plastiden lokalisiert, und sämtliche plastidären Isoprenoide, wie Mono-, Diterpene und Phytolreste der Chlorophylle, werden über ihn synthetisiert (Lichtenthaler 2000). Pilze und Tiere besitzen ausschließlich den cytosolischen Mevalonat-Weg. Die einzige bekannte Ausnahme bilden Protozoen der Gattung *Plasmodium*, die ein grünes, plastidenähnliches Organell, den Apicoplasten, besitzen, in dem Isoprenoide über den MEP-Weg synthetisiert werden (Jomaa, Wiesner et al. 1999). Zur Gattung *Plasmodium* gehört, das für Malaria verantwortliche Bakterium *Plasmodium falciparum*. Ein Großteil aller Bakterien, einschließlich

Escherichia coli und *Mycobakterium tuberculosis* (Tuberkuloseerreger) synthetisieren Isoprenoide über den MEP-Weg.

Die Biosynthese von IPP über den MEP-Weg beginnt mit der Kondensation von Pyruvat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat unter CO_2 -Abspaltung (Abbildung 46). Die Reaktion wird von dem Enzym 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase katalysiert [A]. Das gebildete Intermediat 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ist nicht nur Vorstufe von IPP, sondern dient auch als Vorstufe von Thiamin (Vitamin B_1) und Pyridoxol (Vitamin B_6). Daher wird der nachfolgende Schritt des MEP-Wegs als erster spezifischer Schritt der Isoprenoidsynthese bezeichnet. 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat wird dabei in einer NADPH-abhängigen Reaktion über das Enzym 2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Synthetase (IspC) reduziert und gleichzeitig durch intramolekulare Umlagerung zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat, (MEP) isomerisiert [B]. Das Enzym 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Synthase (IspD) katalysiert den Transfer von CTP auf MEP, dabei entstehen 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol und anorganisches Pyrophosphat [C]. Die 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-Kinase (IspE) überträgt einen Phosphatrest von ATP auf die OH-Gruppe in Position 2 von 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol. Dadurch entsteht 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-2-Phosphat und ADP [D]. 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-2-Phosphat wird nun durch Abspaltung von CMP und eine intramolekulare Zyklisierung zu 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat umgelagert. Diese Reaktion katalysiert das Protein 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Diphosphat-Synthase (IspF) [E]. Der erhaltene intramolekulare Phosphodiester wird mit Hilfe des Enzyms 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat-Reduktase (IspG) wieder gespalten und 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat in 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-butenyl-4-Diphosphat überführt [F]. Im letzten Schritt des MEP-Weges katalysiert das Protein 1-Hydroxy-2-Methyl-Butenyl-4-Diphosphat-Reduktase (IspH) die Bildung der Isomere Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) aus 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-butenyl-4-Diphosphat [G] (Lichtenthaler 1999).

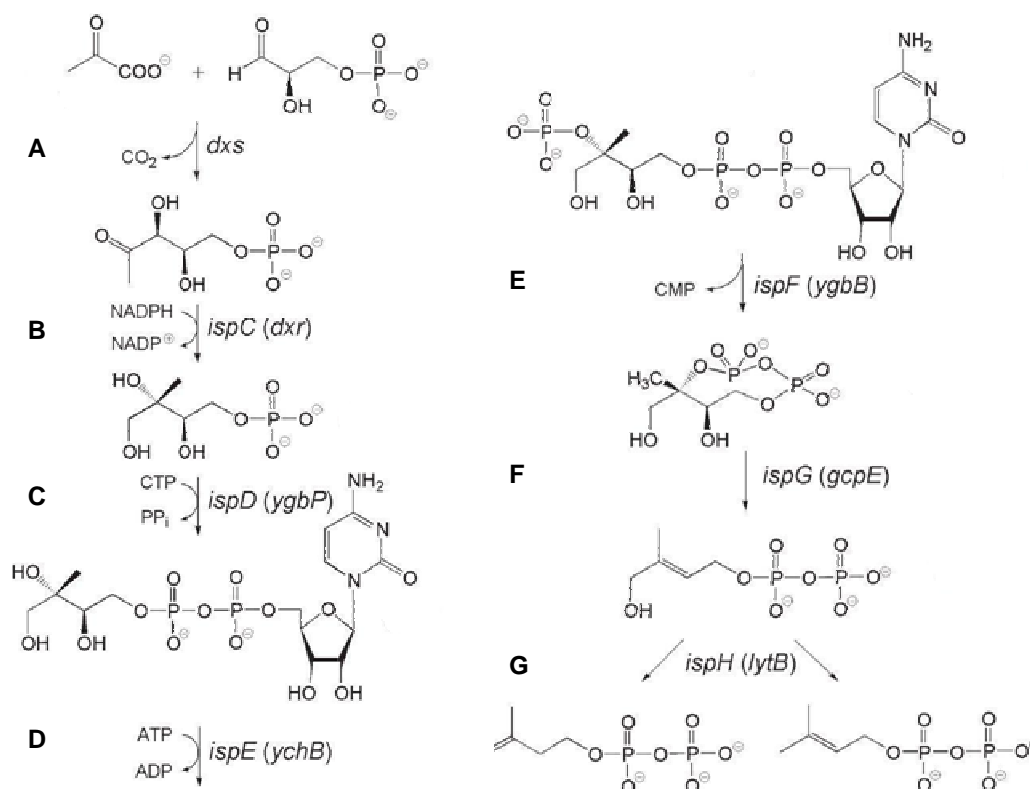


Abbildung 46: Schematische Darstellung des Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweges. A) Kondensation von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat durch *dxs*. B) Reduktion und intramolekulare Umlagerung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zu MEP durch *IspC*. C) Transfer von CTP auf 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-Erythritol durch *IspD*. D) Übertragung eines Phosphatrestes von CTP durch *IspE* auf 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-2-Phosphat. E) Abspaltung von CMP durch *IspF* und intramolekulare Zyklisierung zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat. F) Spaltung des Phosphodiester durch *IspG* zu 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenyl-4-Diphosphat. G) Entstehung der Isomere IPP und DMAPP. (Lichtenthaler 1999).

Die Tatsache, dass der MEP-Weg einerseits von einer Vielzahl an Pathogenen, einschließlich *Mycobacterium tuberculosis* und *Plasmodium falciparum*, zur Isoprenoidbiosynthese verwendet wird und andererseits im menschlichen Organismus Isoprenoide über den Mevalonat-Stoffwechselweg synthetisiert werden, macht die Enzyme des MEP-Stoffwechselweges zu besonders attraktiven Targets für neue Antiinfektiva.

Die atomare Struktur des Enzyms IspD wurde in seiner Apo-Form und im Komplex mit dem Substrat CTP und dem Produkt CDPME aufgeklärt (Richard, Bowman et al. 2001). IspD ist ein Homodimer (Abbildung 47) und jede Untereinheit besteht aus 236 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 25,7 kDa. Die zwei Untereinheiten des Dimers sind über einen seitlich abstehenden „ β -Arm“ miteinander verknüpft. Das aktive Zentrum des Enzyms liegt näher der Schnittfläche des Dimers und wird aus jeweils 6 Segmenten des einen Monomers und einem Segment des anderen Monomers gebildet. Die mit gebundenen Liganden bestimmten Kristallstrukturen des Enzyms zeigen, dass die beiden Substrate CTP und MEP in zwei basischen Taschen binden. Während die CTP-Tasche eine hohe Lösungsmittelzugänglichkeit aufweist, ist die polare MEP-Tasche im Protein vergraben.



Abbildung 47: Darstellung des Enzyms IspD als Cartoonmodell (α -Helices rot; β -Faltblätter gelb und Schleifen grün) mit dem Substrat CDPME (hellblau) in der Bindetasche (PDB-Code 1INI) (Richard, Bowman et al. 2001).

Im Zuge des fragmentbasierten Ansatzes zur Arzneistoffentwicklung (siehe auch Kapite 5) wurde am Beispiel des Enzyms IspD nach neuen Leitstrukturen gegen Malaria und Tuberkulose gesucht. Hierzu wurden insgesamt 24 unterschiedliche Liganden, in Anlehnung an das Substrat CDPME und den Fragmentkriterien, visuell ausgewählt und über einen Thermofluoro-Assay vorab durchgemustert. Anschließend wurden, die sich

im Thermofluoro-Assay als vielversprechend gezeigten Fragmente mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht.

Obwohl die 3D-Struktur von IspD bekannt ist, mussten für die Röntgenstrukturanalyse neue Kristallisationsbedingungen gefunden und etabliert werden, die es zu ließen routinemäßig Fragmente durchzumustern. Um den Bedarf an löslichen und reinen Protein, sowohl beim Thermofluoro-Assay als auch beim Finden neuer, reproduzierbarer Kristallisationsbedingungen zu decken, musste zuerst das bestehende Expressions- und Reinigungsprotokoll aus *E.coli* für IspD hinsichtlich der Proteinausbeute verbessert werden.

6.2 Methoden

6.2.1 Liste der verwendeten Reagenzien und Puffer

Medien: LB-Medium

LB-Kan-Medium

Reagenzien: Bacto-Tryptone

Hefeextrakt

NaCl

Agar

Kanamycin

IPTG

Lysozym

DNase

TRIS

NiSO₄

Imidazol

HEPES

DTT

APS

TEMED

Polyacrylamid

SDS

Glycerin

β-Mercaptoethanol

Bromphenolblau

Comassie-Brilliantblau

Essigsäure

Methanol

Ethanol

MPD

PEG

Na-Cacodylat

MES

Puffer: Lyse-Puffer
Elutionspuffer
Gelfiltrations-Puffer
Dialysepuffer
Probenpuffer
Laemmli-Puffer

6.2.2 Medien und Anzuchtbedingungen

6.2.2.1 Ansetzen des LB-Mediums (Luria-Bertani-Medium (Sambrock 1989))

Die abgewogenen Bestandteile werden in einem Messbecher mit demin. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Das autoklavierte LB-Medium wird nach dem Abkühlen mit 30 mg/l des Antibiotikums Kanamycin (Kan) versetzt, da die Expressionszellen (BL21 DE3 Gold pHis8-IspD) eine Kan-Resistenz besitzen.

LB-Medium (1 l): 10,0 g Bacto-Tryptone

5,0 g Hefeextrakt

10,0 g NaCl

6.2.2.2 Ansetzen des LB-Agars

Mit dem LB-Agar wird, wie in Punkt 6.2.2.1 beschrieben, verfahren. Das autoklavierte und mit Kan versetzte LB-Agar-Medium wird in die für Agarplatten vorgesehenen Petrischalen gegossen. Unter UV-Licht werden die frisch gegossenen Agarplatten abgekühlt und anschließend bei 4° C gelagert.

LB-Agar (1 l): 10,0 g Bacto-Tryptone

5,0 g Hefeextrakt

10,0 g NaCl

15,0 g Agar

6.2.3 Proteinexpression

6.2.3.1 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von exogener DNA in aufnahmebereite, so genannte kompetente Bakterienzellen.

Die kompetenten Zellen (BL21 DE3 Gold) werden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl DNA (pHis8 IspD) versetzt und für 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden im Heizblock bei 42° C für 1 min erwärmt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration werden die kompetenten Zellen mit 500 µl LB-Medium versetzt und 1 h unter leichtem Schütteln (180 rpm) bei 37° C inkubiert. 200 µl der Kultur werden auf einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

6.2.3.2 Ansetzen der Übernachtskultur

Es werden 2x 5 ml LB-Kan-Medium mit jeweils einer von der Agarplatte gewonnenen Kultur angeimpft und über Nacht bei 37° C unter leichtem Schütteln bei 220 rpm im Inkubator inkubiert.

6.2.3.3 Ansetzen der Hauptkultur

Es werden 4x 1 l LB-Kan-Medium in 5 l Erlenmeyerkolben angesetzt. Jede Hauptkultur wird mit 2 ml Übernachtskultur angeimpft und die Zellen werden bei 37° C und 220 rpm inkubiert. Stündlich wird die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Bei einer OD von ca. 1,0 wird die Expression von IspD durch Zugabe von 1 ml 0,5 mM IPTG-Lösung (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Proteinexpression erfolgt für weitere 3 h unter den oben genannten Bedingungen. Jeweils vor und nach der Induktion werden 200 µl Zellproben zur Kontrolle der Expression per SDS-PAGE genommen (siehe 6.2.6).

6.2.3.4 Zellernte

Sind die Kulturen für ausreichende Zeit gewachsen, werden sie durch Zentrifugation (5500 rpm, 15 min, 4° C, JA10 Rotor) geerntet. Das Zentrifugat wird verworfen und die Zellpellets werden jeweils in 5 ml Lyse-Puffer resuspendiert und bei -80° C gelagert.

Lyse-Puffer (1 l): 50 mM TRIS-HCl pH 8,0

100 mM NaCl

pH einstellen und filtrieren

6.2.4 Proteinreinigung

6.2.4.1 Zelllyse

Ein dreistufiges Verfahren wird für die Zelllyse angewendet. Zuerst werden die bei -80° C gelagerten Zellen langsam aufgetaut. Danach werden sie mit 1 µl 10 mg/ml Lysozym pro ml Zellsuspension und einer Spatelspitze DNase 1 versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension in einem Ultraschallgerät (Branson Sonniter250, Micro Tip Limit 5, Duty Cycle 50 %) für 7 min beschallt. Unlösliche Zellrückstände werden per Zentrifugation (17500 rpm, 1 h, 4° C, JA 25 Rotor) entfernt. Der Überstand wird behalten, und es werden Proteinproben sowohl aus dem Pellet als auch aus dem Überstand zur Kontrolle (s.o.) genommen.

6.2.4.2 Affinitätschromatographie

6.2.4.2.1 Regeneration der Säule

Der erste Schritt zur Aufreinigung von IspD mit His₈-Tag besteht aus einer Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (IMAC). Die 5 ml HiTrap Chelating HP Säule (AmershamPharmaziaBiotech) wird mit 20 ml demin. Wasser gewaschen, mit 2,5 ml 0,1 M NiSO₄-Lösung beladen, und die ungebundenen Ni-Ionen werden mit 20 ml demin. Wasser entfernt. Danach wird die Säule mit 20 ml Lyse-Puffer äquilibriert.

6.2.4.2.2 IMAC (immobilised-metal-affinity-chromatography)

Das Zelllysats wird mit Hilfe einer Spritze auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule an die FPLC-Anlage angeschlossen und mit Lyse-Puffer gründlich gewaschen (30faches Säulenvolumen, 3 ml/min). Über einen Stufengradienten (25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM Imidazol) wird IspD-His₈ von der Säule eluiert. IspD-His₈ befand sich in der 200 mM Imidazol-Fraktion.

Elutionspuffer (0,5 l): 500 mM Imidazol

50 mM TRIS-HCl pH 8,0

100 mM NaCl

filtrieren

6.2.4.3 Aufkonzentration des Proteins

Die Proteinlösung wird im Vivaspin 20 (10 000 MWCO) durch Zentrifugation (4500 rpm, 4° C, Rotor 75006441H, Rundbecher) aufkonzentriert. Zuvor wird die Filtermembran auf Dichtheit überprüft und mit Puffer äquilibriert. Die Proteinkonzentration wird UV-spektrometrisch bei 280 nm bestimmt (siehe 6.2.5).

6.2.4.4 Proteinverdau

Der His₈-Tag von IspD wird proteolytisch mit Hilfe der Serinprotease Thrombin abgespalten. Die aufkonzentrierte Proteinlösung wird mit 3 µl Thrombin-Stammlösung (0,3 µl/mg Substratprotein) versetzt und bei RT unter leichtem Schütteln für 15 h inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdaus wird per SDS-PAGE kontrolliert (siehe 6.2.6).

6.2.4.5 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Bei der GPC, oder auch SEC, handelt es sich um eine Gelfiltration, die dazu dient, Proteine der Größe nach aufzutrennen. Die verwendete Säule ist eine Superdex 200HiLoaded 26/60 mit einem Volumen von 240 ml. Die Säule wird über Nacht mit 2fachem Säulenvolumen filtrierten, demin. Wasser gewaschen (0,5 ml/min). Anschließend wird die Säule mit 1,5fachem Säulenvolumen Gelfiltrations-Puffer gespült (3 ml/min). Die Probenschleife (2 ml) wird mit 20 ml demin. Wasser und 20 ml Gelfiltrations-Puffer gewaschen. 2 ml IspD werden auf die Säule geladen, und das Protein wird bei 3 ml/min mit Gelfiltrationspuffer von der Säule eluiert.

Gelfiltrationspuffer (2 l): 10 mM HEPES pH 7,0

1 mM DTT

filtrieren und entgasen

6.2.4.6 Dialyse

Durch Dialyse wird IspD vom Gelfiltrationspuffer in den Kristallisationspuffer überführt.

Der aus regenerierter Cellulose bestehende Dialyseschlauch (MWCO: 12000-14000, Zellu Trans) wird mit Dialysepuffer gewaschen und an einem Ende zugeknotet. Die Proteinlösung wird mit einer Pasteurpipette in den Schlauch gefüllt und dieser mit einem Klipp verschlossen. Die Dialyse erfolgt gegen 3 l Dialysepuffer unter leichtem Rühren bei 4° C über Nacht.

Dialysepuffer (3 l): 10 mM HEPES pH 8,0

100 mM NaCl

1 mM DTT

filtrieren

6.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteinlösung wird nach dem Verfahren von Gill und v. Hippel bestimmt (Gill and von Hippel 1989). Diese Proteinbestimmungsmethode beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren und Disulfidbrücken bei 280 nm. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das Protein nicht denaturiert wird.

Grundlage der Proteinkonzentrationsbestimmung ist das Lambert-Beersche Gesetz. Als Näherung wird folgende Formel verwendet:

$$c[\text{mg/ml}] = \frac{A_{280} * M_R}{\epsilon_{280} * d} * \frac{V_{\text{Küvette}}}{V_{\text{Protein}}} = A_{280} * \text{Faktor} * \text{Verdünnung}$$

c = Enzymkonzentration; A_{280} = Absorption bei 280 nm; ϵ_{280} = Extinktionskoeffizient; M_R = Molekulargewicht des Proteins; d = Schichtdicke der Quarzküvette, 1 cm

Das Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient können über die Proteindatenbank „SwissProt“ in Erfahrung gebracht werden (Gasteiger, Gattiker et al. 2003).

6.2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli 1970) besteht das Gel aus zwei, sich in der Porengröße unterscheidenden Teilgelen, dem Trenngel und dem Sammelgel. Die aufgetragenen Proben werden zunächst im Sammelgel fokussiert und später im Trenngel durch Siebeffekt der Größe nach aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine und maskiert auch deren Eigenladung, so dass die Proteine nicht,

wie bei der Elektrophorese üblich, nach Ladung, sondern hauptsächlich nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

6.2.6.1 Herstellung der Gele

Die Gele entstehen durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid. Hierbei dienen APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter und TEMED (Tetramethylethyldiamin) als Stabilisator. Nach dem Gießen des Trenngels wird es mit Isopropanol überschichtet, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern. Das Gel benötigt ca. 1 – 2 h zur Polymerisation. Nach der Polymerisation des Trenngels und dem Entfernen des Isopropanols wird das Sammelgel gegossen und der Probenkamm aufgesteckt.

Zusammensetzung des Trenngels: 15 % Polyacrylamid/Bisacrylamid

250 mM TRIS-Puffer pH 8,8

0,1 % SDS

*→ 5 ml der Stammlösung, in der die oben aufgeführten
Konzentrationen vorliegen*

10 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

100 µl APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Zusammensetzung des Sammelgels : 5 % Polyacrylamid/Bisacrylamid

125 mM TRIS-Puffer pH 6,8

0,1 % SDS

*→ 2,5 ml der Stammlösung, in der die oben aufgeführten
Konzentrationen vorliegen*

10 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

100 µl APS (Ammoniumperoxodisulfat)

6.2.6.2 Auftragen der Proben

Die Proben werden im Verhältnis 1:1 bis 1:3, je nach Konzentration des Proteins mit Probenpuffer versetzt und 5 min im Heizblock bei 95° C denaturiert.

Probenpuffer (pH 6,8): 100 mM TRIS-HCl pH 6,8

40 % Glycerin

10 % β -Mercaptoethanol

3,2 % SDS

0,002 % Bromphenolblau

In der Zwischenzeit werden die Geltaschen mit Laemmli-Puffer gewaschen. Anschließend werden jeweils 5-10 μ l Probe und 7 μ l Marker aufgetragen und eine Stromstärke von 15 mA/Gel angelegt. Sind die Proben in das Trenngel gelangt, kann die Stromstärke auf 30 mA/Gel erhöht werden.

10x Laemmli-Puffer: 30,2 g TRIS-HCl pH 8,3

188 g Glycin

100 ml 10 % SDS

ad 1000 ml H₂O bidest.

6.2.6.3 Färben der Gele

Die SDS-Gele werden mit Coomassie-Brilliantblau-Farbstoff angefärbt. Es handelt sich dabei um einen Triphenylmethanfarbstoff, der ein Absorptionsmaximum von 465 - 595 nm besitzt. Der Farbstoff bindet an saure und basische Aminosäuren, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes auf 595 nm verschiebt.

Zum Färben wird ein Gel für 10 min unter leichtem Schütteln in der Färbelösung inkubiert. Das Gel wird anschließend mit Entfärberlösung versetzt und für 3 h unter leichtem Schütteln inkubiert.

Zusammensetzung der Färbelösung: 0,2 % Coomassie Brilliant Blau G-250

10 % Essigsäure

50 %Methanol

Zusammensetzung der Entfärberlösung: 7,5 % Essigsäure

30 % Ethanol

6.3 Thermofluoro-Assay

Beim Thermofluoro-Assay handelt es sich um eine Methode, um Schmelzpunktveränderungen von Proteinen durch Fluoreszenzdetektion zu erkennen (Abbildung 48). Mit steigender Temperatur denaturiert das Enzym und die hydrophoben Kernregionen treten vermehrt zum Vorschein. An diese hydrophoben Bereiche bindet der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO-ORANGE. Die Fluoreszenzemission ist dabei linear abhängig von der Anzahl der Farbstoffmoleküle, die an das Protein gebunden sind. Mittels PCR-Geräten kann durch schrittweise Erhöhung der Temperatur der Schmelzpunkt des Proteins detektiert werden. Ist das Protein vollständig denaturiert, liegt der Fluoreszenzfarbstoff wieder frei in Lösung vor. Aufgrund von Ligandbindung an das Protein kommt es zu einer Stabilisierung des Faltungsmusters und somit zu einer Schmelzpunkterhöhung (Cummings, Farnum et al. 2006; Niesen, Berglund et al. 2007; Nettleship, Brown et al. 2008).

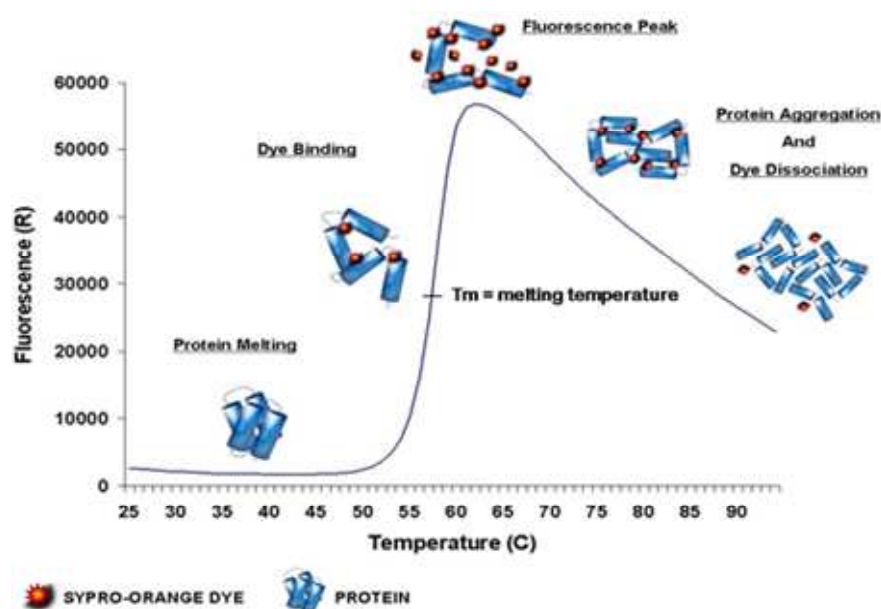
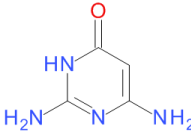
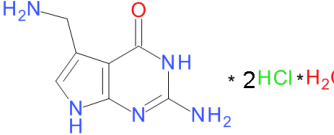
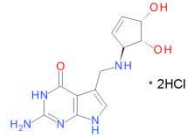
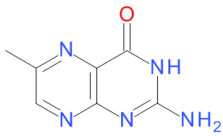
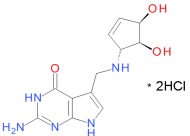
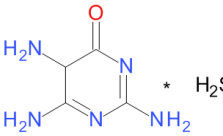
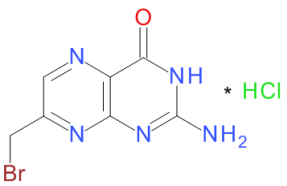
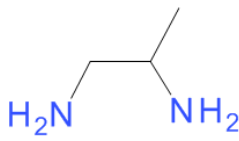
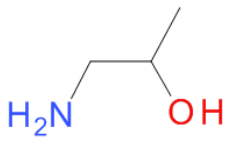
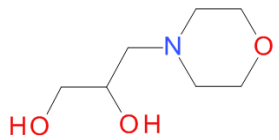
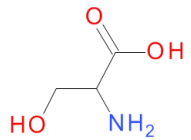
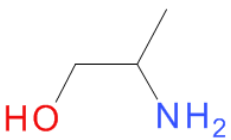
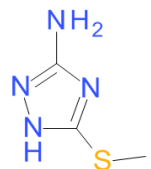
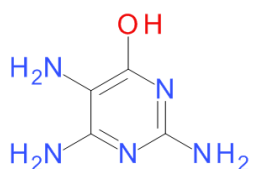
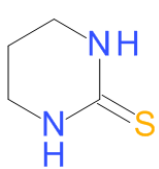
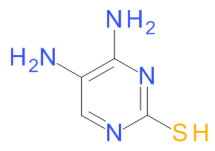
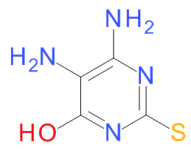
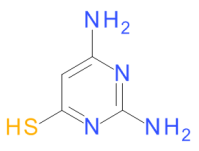
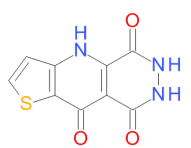
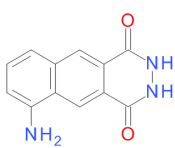
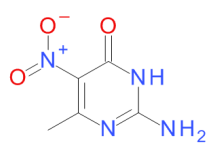


Abbildung 48: Graphische Darstellung des Thermofluoro-Assays (Quelle: Argonne National Laboratories, USA; <http://www.anl.gov/>)

Insgesamt wurden 24 Liganden (siehe Tabelle 11), die sowohl funktionellen Bereichen des Substrates CDPME als auch den Fragmetkriterien entsprechen, visuell ausgewählt und mittels Thermofluoro-Assay an dem Enzym IspD vermessen. Die Ligandenkonzentration betrug jedes Mal 10 mM bei einer Proteinkonzentration von 100 μ M. Es wurden zum Vergleich insgesamt drei Meßreihen aller 24 Liganden mit sowohl einer Blind- und einer Vergleichsprobe durchgeführt. Der Puffer (100 ml) für die Blindprobe enthielt 100 μ M IspD, 100 mM HEPES pH 8.0 und 1 – 10 % DMSO, in Abhängigkeit der DMSO Konzentration in der Vergleichsprobe. Der Puffer (100 ml) für die Vergleichsprobe enthielt ebenfalls 100 μ M IspD, 100 mM HEPES pH 8.0, 10 mM Ligand und 1 – 10 % DMSO, je nach Löslichkeit des Liganden. Nachdem der Ligand für ca. 3 Stunden mit dem Protein äquilibrierte, wurde der Farbstoff SYPRO-ORANGE in einer Verdünnung 1:1000 hinzugegeben. Anschließend wurde mittels PCR-Gerät (Bio-RAD iQ5) ein Temperaturgradient in 0,5 °C Schritten von 20 – 80 °C durchgeführt. Die Liganden 1 – 7 und 13 – 24 wurden freundlicherweise von Hans Dieter Gerber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Von der Firma Sigma-Aldrich wurden die Liganden 8 – 12 käuflich erworben.

<p><u>Ligand 1</u></p>  <p>2,4-Diamino-1H-Pyrimidin-6-on</p> <p>M_R: 126,12 g/mol</p>	<p><u>Ligand 2</u></p>  <p>2-Amino-5-(aminomethyl)-3,7-Dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on</p> <p>M_R: 270,12 g/mol</p>	<p><u>Ligand 3</u></p>  <p>2-Amino-5-[[[(4S,5R)-4,5-dihydroxycyclopent-2-en-1yl]amino]methyl]-3,7-dihydropyrrolo[2,3-]pyrimidin-4-on</p> <p>M_R: 349,07 g/mol</p>
<p><u>Ligand 4</u></p>  <p>2-Amino-6-methyl-3H-pteridin-4-on</p> <p>M_R: 177,06 g/mol</p>	<p><u>Ligand 5</u></p>  <p>2-Amino-5-[[[(4R,5S)-4,5-dihydroxycyclopent-2-en-1yl]amino]methyl]-3,7-dihydropyrrolo[2,3-]pyrimidin-4-on</p> <p>M_R: 349,07 g/mol</p>	<p><u>Ligand 6</u></p>  <p>2,5,6-Triamino-5H-pyrimidin-4-on</p> <p>M_R: 239,12 g/mol</p>

<p><u>Ligand 7</u></p>  <p>2-Amino-7-(bromomethyl)-3H-pteridin-4-on M_R: 292,52 g/mol</p>	<p><u>Ligand 8</u></p>  <p>Propan-1,2-diamin M_R: 75,11 g/mol</p>	<p><u>Ligand 9</u></p>  <p>1-Aminopropan-2-ol M_R: 74,12 g/mol</p>
<p><u>Ligand 10</u></p>  <p>3-Morpholinopropan-1,2-diol M_R: 161,20 g/mol</p>	<p><u>Ligand 11</u></p>  <p>2-Amino-3-hydroxypropansäure M_R: 105,09 g/mol</p>	<p><u>Ligand 12</u></p>  <p>2-Aminopropan-1-ol M_R: 75,11g/mol</p>
<p><u>Ligand 13</u></p>  <p>5-Methylsulfanyl-1H-1,2,4-triazol-3-amin M_R: 130,17 g/mol</p>	<p><u>Ligand 14</u></p>  <p>2,5,6-Triaminopyrimidin-4-ol M_R: 141,13 g/mol</p>	<p><u>Ligand 15</u></p>  <p>Hexahydropyrimidin-2-thion M_R: 116,08 g/mol</p>
<p><u>Ligand 16</u></p>  <p>4,5-Diaminopyrimidin-2-thiol M_R: 142,18 g/mol</p>	<p><u>Ligand 17</u></p>  <p>5,6-Diamino-2-sulfanyl-pyrimidin-4-ol M_R: 158,18 g/mol</p>	<p><u>Ligand 18</u></p>  <p>2,6-Diaminopyrimidine-4-thiol M_R: 142,18 g/mol</p>
<p><u>Ligand 19</u></p>  <p>6,7-Dihydro-4H-1-thia-4,6,7-cyclopenta[b]naphthalene-5-en M_R: 235,22g/mol</p>	<p><u>Ligand 20</u></p>  <p>6-Amino-2,3-dihydrobenzo[g]phthalazin-1,4-dion M_R: 227,22 g/mol</p>	<p><u>Ligand 21</u></p>  <p>(2-amino-4-methyl-6-oxo-1H-pyrimidin-5-yl)azinat M_R: 171,14 g/mol</p>

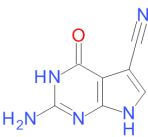
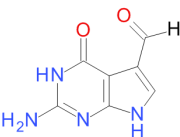
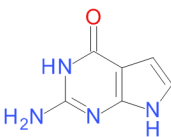
Ligand 22	Ligand 23	Ligand 24
 <p>2-Amino-4-oxo-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-carbonitril</p> <p>M_R: 175,15 g/mol</p>	 <p>2-Amino-4-oxo-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-carbaldehyd</p> <p>M_R: 178,15 g/mol</p>	 <p>2-Amino-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on</p> <p>M_R: 150,40 g/mol</p>

Tabelle 11: Detaillierte Darstellung der Liganden, die beim Thermofluoro-Assay benutzt wurden

6.4 Protein-Kristallographie

6.4.1 Sitzende-Tropfen-Methode

Bei der Kristallisation von IspD wurde die Sitzende-Tropfen-Methode angewendet (siehe Kapitel 4.2.1). Die genaue Beschreibung der Kristallisationsbedingungen kann dem Abschnitt 6.5.3 entnommen werden.

6.4.2 Ligandensoaking

IspD-Kristalle wurden mit dem Liganden 20 aus dem Thermofluoro-Assay (siehe Kapitel 6.3) in den Endkonzentrationen 12,5 mM, 25 mM und 50 mM gesoakt (siehe 5.1.1.2). Beim Liganden 20 handelt es sich um 6-Amino-2,3-dihydrobenzo[g]phthalazin-1,4-dion mit einem Molekulargewicht von 227,22 g/mol. Eine 125 mM Stocklösung, bestehend aus 100 % DMSO und Ligand 20, wurde hergestellt und zum Soaken verwendet. Um die oben angegebenen finalen Konzentrationen zu erreichen, wurde die Stocklösung mit dem Kristallisationspuffer verdünnt.

6.5 Ergebnisse

6.5.1 Expression und Reinigung des Proteins IspD

6.5.1.1 Transformation des Expressionsvektors

Der Expressionsvektor pHis₈-IspD codiert das *E. coli* IspD Gen mit N-terminalem His₈-tag, gefolgt von einer Thrombinschnittstelle. Die Transkription erfolgt über die T7-Polymerase und wird per Lac-Repressor kontrolliert (Dubendorff and Studier 1991). Der Vektor wurde per Transformation in kompetente *E. coli* BL21 DE3 Gold Zellen eingeschleust.

Der Expressionsvektor pHis₈-IspD wurde von Prof. Dr. Peter Noel (The Salk Institute, La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

6.5.1.2 Proteinexpression

Die Expression von IspD-His₈ erbrachte, wie im Punkt 6.2.3 beschrieben in 4 l Bakterienansatz nach Zentrifugation 11,1 g Zellen (Nassgewicht).

Die gewonnenen Zellen wurden in 2x 30 ml Lyse-Puffer resuspendiert und bei -80°C gelagert.

6.5.1.3 Proteinreinigung

Der erste Schritt der Proteinreinigung ist die Zelllyse. Die Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit Lysozym und DNase 1 inkubiert und durch Ultraschallaufschluss lysiert (s. Punkt 6.2.4.1)

Im Anschluss erfolgte die Reinigung von IspD-His₈ mittels einer IMAC über eine 5 ml HiTrap Chelating HP Säule (s. Punkt 6.2.4.2.2). IspD-His₈ wurde in einem Stufengradienten von 0 – 500 mM Imidazol bei 200 mM von der Säule eluiert (Abbildung 49).

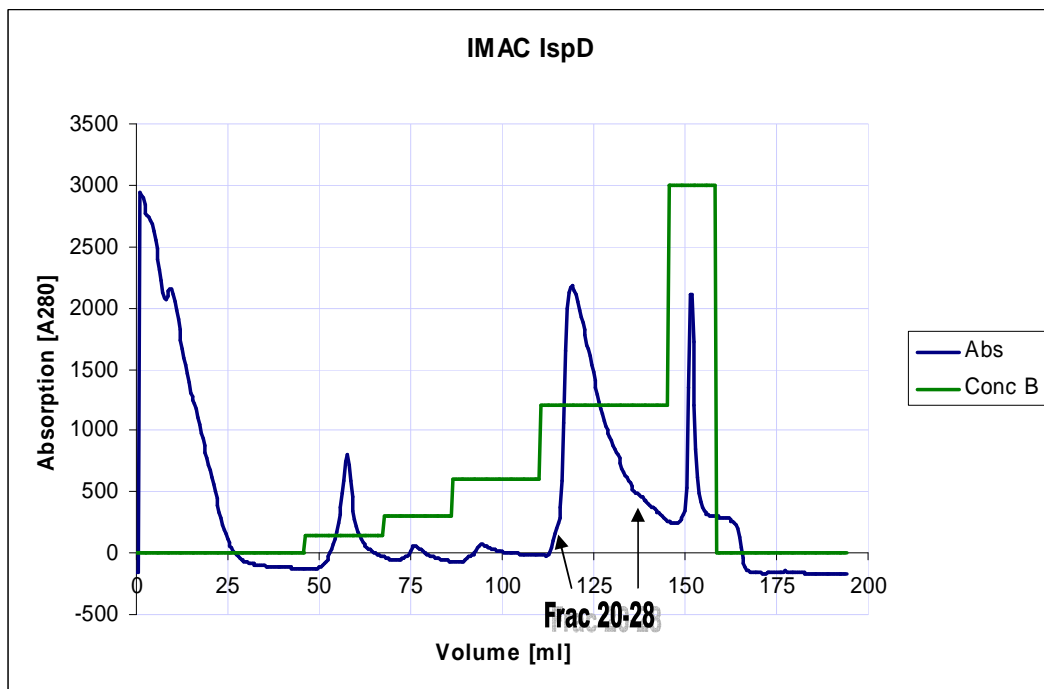


Abbildung 49: Elutionsdiagramm der IMAC

Die Fraktionen 20-28 wurden vereinigt und wie im Punkt 6.2.4.3 beschrieben aufkonzentriert. Abbildung 50 zeigt, dass die Expression erfolgreich verlaufen ist und dass nach der IMAC reines IspD erhalten wurde.

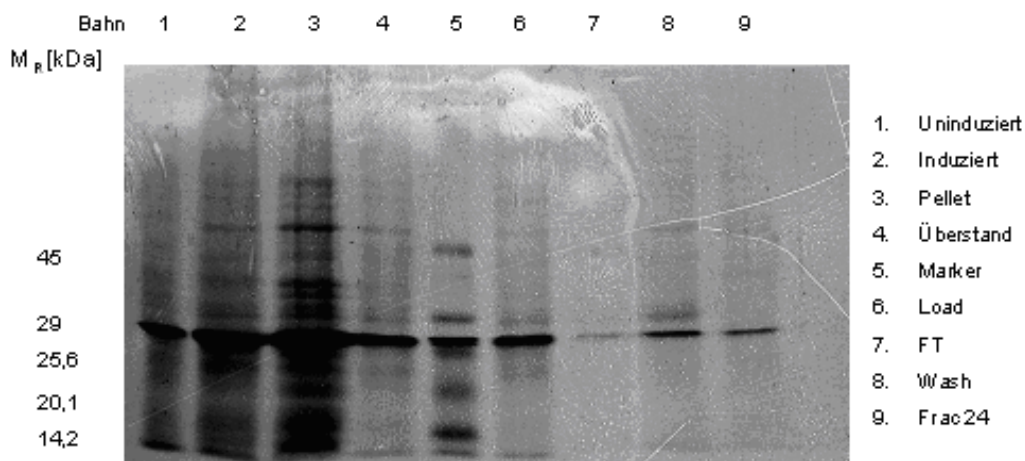


Abbildung 50: SDS-PAGE der ersten Expressionsschritte bis zur Aufreinigung durch IMAC; 5 μ l Probenlösung. Als Marker wurde der SDS-7-Marker 14 – 70 kDa verwendet.

Der His-Tag von IspD-His₈ wurde durch Thrombin-Verdau spezifisch an der Thrombinschnittstelle abgespalten. Der Fortschritt des Verdaus wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 52).

Das resultierende IspD wurde über eine Superdex 200 HiLoad 26/60 Säule gereinigt. Abbildung 51 zeigt das bei der GPC aufgenommene Elutionsdiagramm.

Das Elutionsprofil wies bei 150-190 ml eine erhöhte Absorption auf, und die entsprechenden Fraktionen 18-21 wurden vereinigt.

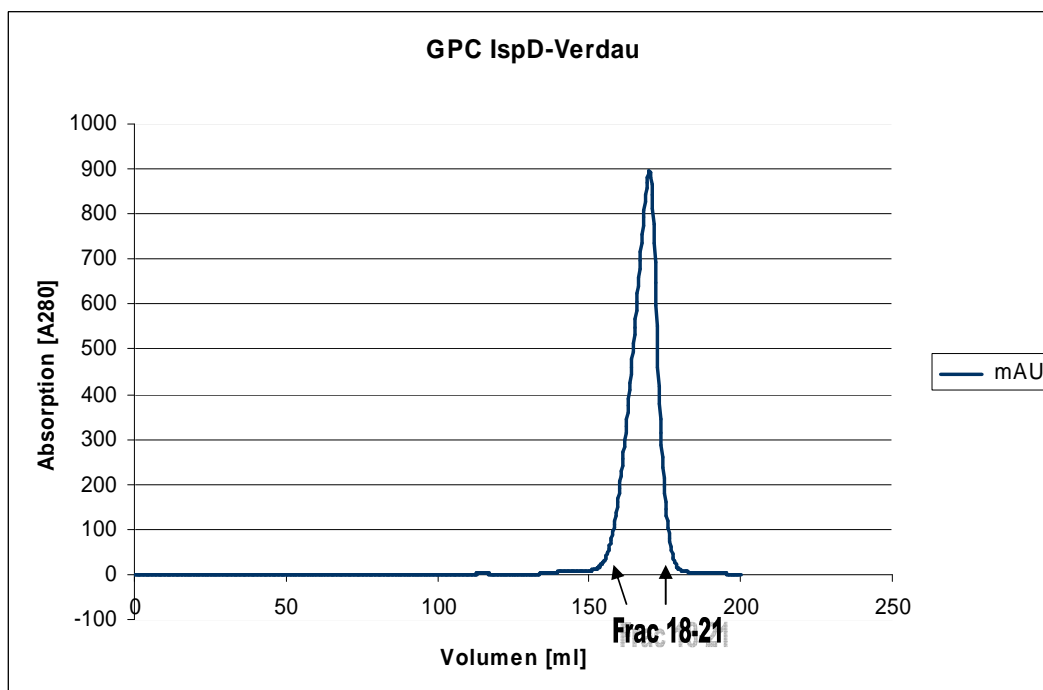


Abbildung 51: Elutionsdiagramm der GPC des Proteinverdaus

Der Verlauf der Reinigung wurde wiederum mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 52).

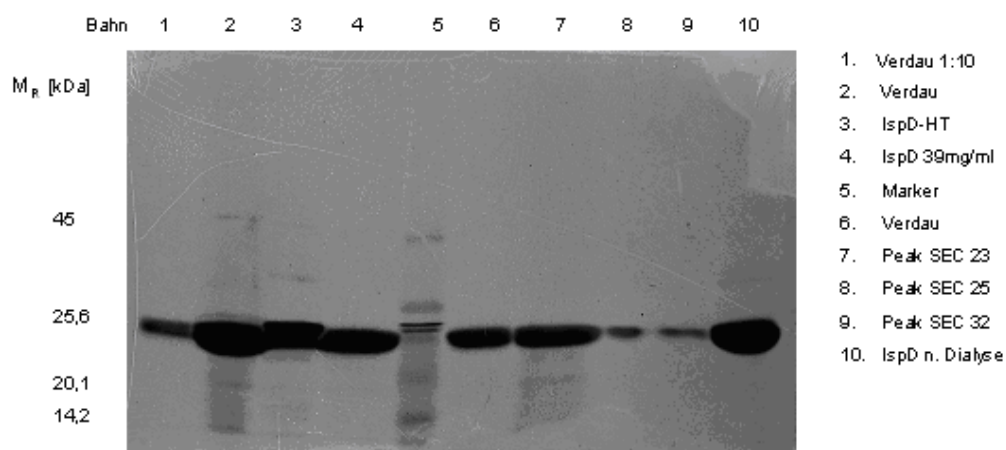


Abbildung 52: SDS-PAGE des Proteinverdaus und der SEC; 5 μ l Probenlösung, 7 μ l Marker pro Tasche. Als Marker wurde der SDS-7-Marker 14 – 70 kDa verwendet.

Die anschließende Konzentrationsbestimmung (siehe 6.2.5) ergab eine IspD-Konzentration von 7,8 mg/ml bei einem Gesamtvolumen von 26,7 ml Proteinlösung. Somit wurde eine Ausbeute von 208 mg IspD aus 4 l Bakterienkultur erzielt.

Die Proteinlösung wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf 39 – 64,5 mg/ml aufkonzentriert und in 200 μ l-Portionen bei -80°C gelagert.

6.5.2 Thermofluoro-Assay

Alle 24 Liganden wurden durch den Thermofluoro-Assay in einer Konzentration von 10 mM und einer Proteinkonzentration von 100 μ M drei Mal vermessen (siehe Kapitel 6.3). Anhand der Differenz des Mittelpunktes der beiden Schmelzpunktgeraden einer Messreihe kann die ggf. auftretende Temperaturerhöhung berechnet bzw. anhand des Graphen ermittelt werden. Zur Veranschaulichung siehe hierzu Abbildung 53.

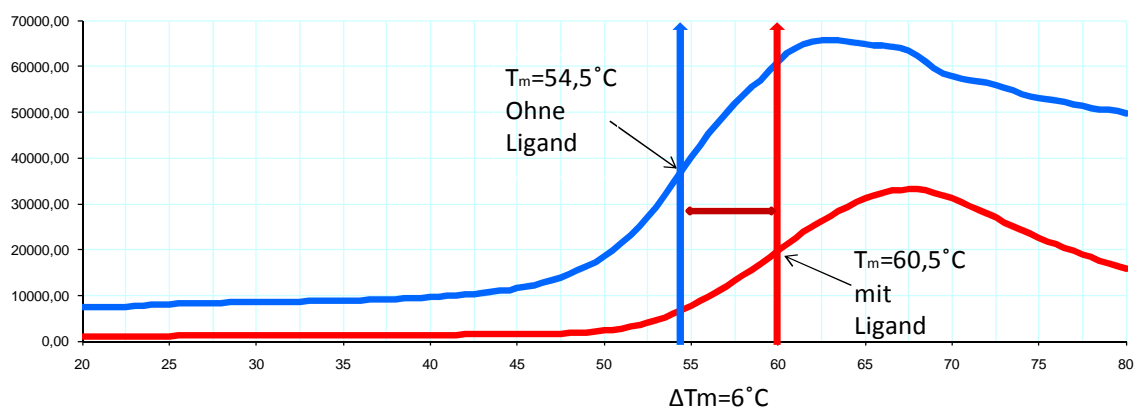


Abbildung 53: Darstellung der Ermittlung der Schmelztemperaturerhöhung im Thermofluoro-Assay. Die Differenz der Mittelpunkte der Schmelzpunktgeraden kann an der X-Achse (Temperatur) abgelesen werden. Der blaue Graph zeigt die Schmelzpunktkurve des Proteins ohne Liganden, der rote Graph die Schmelzpunktkurve des Proteins mit Liganden.

Lediglich die Liganden 6, 18, 20, 22, 23 und 24 zeigten in den drei Messungen jeweils eine Schmelzpunkterhöhung. Dabei erwiesen sich die Liganden 20, 22, 23 und 24 mit einer durchschnittlichen Schmelzpunkterhöhung von 7,5; 5; 6 bzw. 7 °C als sehr vielversprechend. Aber auch die Liganden 6 und 18 erhöhten den Schmelzpunkt von IspD jeweils um 2 °C (Abbildung 54).

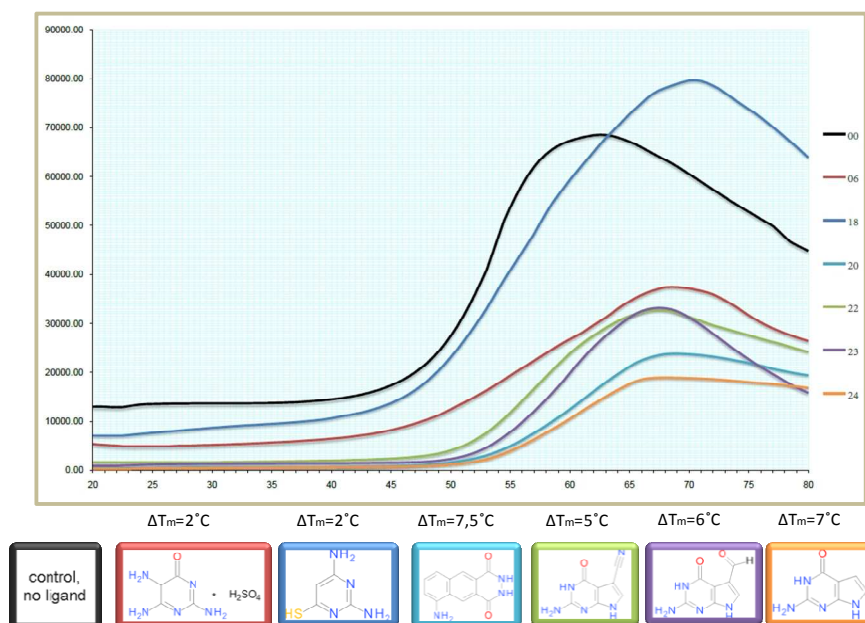


Abbildung 54: Darstellung der Liganden, die im Thermofluoro-Assay eine Schmelzpunkterhöhung gezeigt haben. Das reine Protein ist in schwarz, Ligand 6 in rot, Ligand 18 in hellblau, Ligand 20 in pink, Ligand 22 in grün, Ligand 23 in blau und Ligand 24 in gelb dargestellt.

6.5.3 Kristallisation von IspD

Alle Kristallisationsansätze wurden nach Methode des sitzenden Tropfens (siehe Kapitel 6.4.1), mit einer Tropfengröße von 2 – 4 µl und einem Reservoirvolumen von 500 µl bei 18° und 4° C sowohl mit IspD-His₈-tag als auch mit verdaulichem IspD in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt (siehe Tabelle 12). Die verwendeten Kristallisationsscreens Cryo I und II, Wizard I und II (beide Screens stammen von Emerald BioSystem), PEG/Ion und CrystalScreen I (beide Screens stammen von Hampton Research) wurden von C. Sohn, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg entsprechend den Herstellerangaben hergestellt.

Screen	Cryo I 1 - 48	Cryo II 1 – 48	Wizard I 1 - 48	Wizard II 1 - 48	PEG/Ion 1 – 48	CrystalScreen 1 - 48
Protein-Konzentration	34 mg/ml	34 mg/ml	34 mg/ml	34 mg/ml	39 mg/ml	39 mg/ml
	39 mg/ml	39 mg/ml	39 mg/ml	39 mg/ml	44,9 mg/ml	44,9 mg/ml
	44,9 mg/ml	44,9 mg/ml	44,9 mg/ml	44,9 mg/ml		
	50,4 mg/ml	50,4 mg/ml				
	39 mg/ml HT	39 mg/ml HT				
Temperatur	18° & 4° C	18° & 4° C	18° & 4° C	18° & 4° C	18° & 4° C	18° & 4° C

Tabelle 12: Tabellarische Aufstellung der zu Beginn verwendeten Kristallisationsscreens

Vielversprechende Kristallisationsansätze von IspD mit und ohne His-Tag konnten in den Screens Cryo I (2, 12, 13, 16 und 46), Cryo II (1, 12, 23, 25, 43, und 44), PEG/Ion (1, 20, 38 und 48), CrystalScreen (30) sowie Wizard I (45) und Wizard II (42) erzielt werden. Diese Ansätze wurden durch erneute Durchführung bei 18° und 4° C in den Protein-Konzentrationen 30 mg/ml, 34,5 mg/ml, 39,0 mg/ml, 44,9 mg/ml und 50,4 mg/ml, sowie 64,5 mg/ml mit His-tag genauer untersucht.

Reproduzierbare IspD-Kristalle wurden mit den Bedingungen aus Cryo I (46) und Cryo II (1, 17 und 23) erhalten. IspD mit und ohne His-tag kristallisierte am besten bei einer Proteinkonzentration von 34,5 mg/ml mit der Bedingung 1 des Cryo Screens I

sowie der Bedingung 23 des Cryo Screens II der Firma EmeraldBioStructures. Die Kristallisationsansätze enthielten jeweils 40 % MPD, 5 % PEG-8000, und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5, bzw. 30 % 1,2-Propandiol, 40 % PEG 400 und 0,1 M HEPES pH 7,5.

In einer gründlichen Durchmusterung verschiedener Puffer, pH-Werte und Fällungsmittelkonzentrationen der Kondition 1 des Cryo Screens I der Firma EmeraldBioStructures konnte die Morphologie der Kristalle stark verbessert werden. Die Bedingungen des Feinscreens können der Tabelle 13 entnommen werden.

Proteinkonzentration	Puffer	Additive	pH-Wert
34,5 mg/ml (+HT) (50 mM Tris/HCl pH 7,3; 100 mM NaCl; 1 mM DTT)	30 – 48 % (v/v) 2-Methyl- 2,4-Pentandiol	0 – 12 % (w/v) PEG-8000	0,1 M HEPES pH 7,0
34,5 mg/ml (+HT) (50 mM Tris/HCl pH 7,3; 100 mM NaCl; 1 mM DTT)	30 – 48 % (v/v) 2-Methyl- 2,4-Pentandiol	0 – 12 % (w/v) PEG-8000	0,1 M MES pH 6,5
34,5 mg/ml (+HT) (50 mM Tris/HCl pH 7,3; 100 mM NaCl; 1 mM DTT)	30 – 48 % (v/v) 2-Methyl- 2,4-Pentandiol	0 – 12 % (w/v) PEG-8000	0,1M Pipes pH 6,5
34,5 mg/ml (+HT) (50 mM Tris/HCl pH 7,3; 100 mM NaCl; 1 mM DTT)	30 – 48 % (v/v) 2-Methyl- 2,4-Pentandiol	0 – 12 % (w/v) PEG-8000	0,1M Natrium- cacodylat pH 6,5

Tabelle 13: Tabellarische Auflistung des Feinscreens von IspD mit und ohne His₈-tag (HT)

Die erhaltenen Kristalle (Abbildung 55; links) sind unter den Kristallisationsbedingungen 38 % MPD; 8 % PEG 8000, und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 über Nacht gewachsen und konnten direkt aus der Kristallisationslösung gefroren werden. Die Kristalle streuten an der hauseigenen Röntgenanlage bis zu einer Auflösung von 2,8 Å (Abbildung 55; rechts). Wurden Kristalle mit IspD-HT unter den

gleichen Bedingungen erzeugt, zeigten diese ein wesentlich besseres Streuverhalten. An der hauseigenen Röntgenanlage streuten diese Kristalle bis 2,34 Å.

Anhand der erhaltenen Messergebnisse konnte ein primitiv orthorhombisches Kristallgitter mit der Raumgruppe $P2_12_12_1$ ermittelt werden. Eine Einheitszelle wies die Maße 41x 82x 138 Å auf.

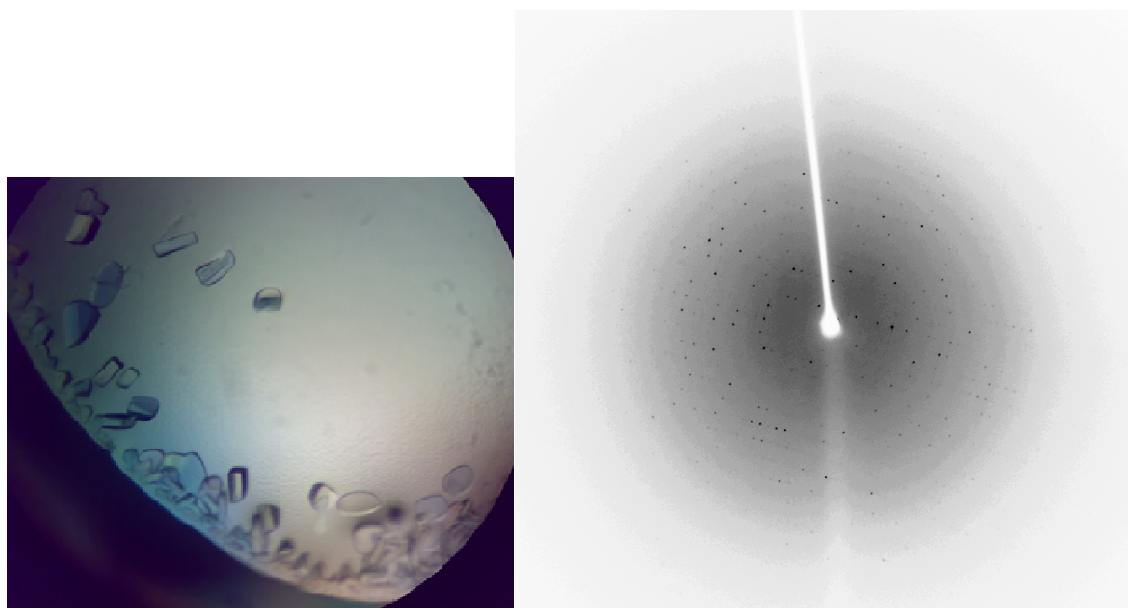


Abbildung 55: Das Bild links zeigt die unter den o.g. Bedingungen gewachsenen und vermessenen IspD-HT Kristalle. Rechts zeigt das an der hauseigenen Röntgenanlage (Rigaku RU-H3R mit rotierender 50 kV Kupferanode ($\lambda = 1.5418$ Å), 90 mA, fokussierenden Spiegeln (Osmic mirrors) und einem RAXIS⁺⁺ „image plate“ Detektorsystem) erhaltene Diffraktionsbild.

6.5.4 Liganden Soaking

IspD-Kristalle wurden mit dem Liganden 20 aus dem Thermofluoro-Assay (siehe Kapitel 6.3) in den Endkonzentrationen 12,5 mM, 25 mM und 50 mM einem *Soaken* unterworfen (siehe Kapitel 6.4.3). Die Kristalle zum *Soaken* wurden unter der Bedingung 38 % MPD; 8 % PEG-8000 und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 erhalten. Bei einer Ligandenkonzentration von 50 mM zerbrachen die IspD-Kristalle umgehend, so dass diese nicht vermessen werden konnten. Die Proteinkristalle, die mit 25 mM behandelt waren, konnten direkt aus der Lösung gefroren und vermessen werden. Die Kristalle wurden an der Synchrotron Beamline BL14.2 am BessyII des Helmholtz-Zentrums Berlin für Material und Energie gemessen. Aufgrund der niedrigen Streu- und

Datenqualität konnte der Datensatz nicht ausgewertet und somit das Bindungsverhalten von Ligand 20 bis zu diesem Zeitpunkt nicht weiter untersucht werden.

6.6 Zusammenfassung und Ausblick

Aus einem 4 l Ansatz *E. coli* BL21 DE3 Gold konnten 208 mg IspD gewonnen werden. Nach Aufreinigung und Dialyse wurde das gewonnene Protein in 200 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Im Thermofluoro-Assay wurden alle 24 Liganden dreimal als Blind- und Vergleichsprobe vermessen. Lediglich die Liganden 6, 18, 20, 22, 23 und 24 zeigten eine Schmelztemperatur Erhöhung von 2 – 7,5 °C.

Bei der Kristallisation von IspD mit und ohne His₈-tag wurden Kristalle mit den Stocklösungen der kommerziell erhältlichen Screens Cryo I (2, 12, 13, 16 und 46), Cryo II (1, 12, 23, 25, 43, und 44), PEG/Ion (1, 20, 38 und 48), CrystalScreen (30) sowie Wizard I (45) und Wizard II (42) erhalten. Diese Kristalle konnten zum Teil reproduziert und in einem Feinscreen aus unterschiedlichen Puffer- und Additivkonzentrationen morphologisch verbessert werden. Morphologisch gute Kristalle konnten unter den Bedingungen 38 % MPD; 8 % PEG 8000 und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 sowohl mit HT als auch ohne erhalten werden. Die Kristalle von IspD-HT zeigten im Gegensatz zu den unter gleichen Bedingungen erhaltenen Kristallen ohne HT ein wesentlich verbessertes Streuverhalten.

Durch *Soaken* der Kristalle wurde versucht den potentiellen Liganden 20 per Diffusion in die Bindetasche des Enzyms einzulagern. Der Bindungsmodus sollte dann durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Die gesoakten IspD-Kristalle streuten an der Synchrotron Beamline BL14.2 am BessyII des Helmholtz-Zentrums Berlin für Material und Energie bis zu einer Auflösung von 2.67 Å. Aufgrund der niedrigen Streu- und Datenqualität der Kristalle konnte der aufgenommene Datensatz nicht ausgewertet werden. Gründe für die schlechte Streu- und Datenqualität könnten in den *Soakingbedingungen* mit zu hoher Ligandkonzentration, dem Lösungsmittel DMSO, der leichten Verdünnung des Kristallisationstropfens beim Tränken und den beobachteten kleinen Rissen im Kristall liegen. Röntgentaugliche Kristalle könnten durch *Soaking* mit

niedrigerer Ligandkonzentration, Verwendung eines anderen Lösungsmittels oder durch Co-Kristallisation erhalten werden. Die weitere Optimierung der hier etablierten Kristallisations- und *Soakingbedingungen* sollte in absehbarer Zeit hochwertige Kristalle für die strukturelle Charakterisierung der IspD-Ligand Wechselwirkungen liefern.

7 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden unterschiedliche Bereiche behandelt, in denen die Proteinkristallographie wichtige Beiträge liefert und zwar bei der *de novo* Strukturaufklärung von Makromolekülen über Fragmentenscreening mittels Röntgenstrukturanalyse bis hin zur strukturbasierten Entwicklung neuer Leitstrukturen im Kampf gegen Malaria und Tuberkulose. Beim Erstellen dieser Arbeit wurden insgesamt ca. 200 Datensätze unterschiedlicher Proteine und Proteinkomplexe aufgenommen und ausgewertet. Diese hohe Anzahl war erforderlich, um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse zu validieren, um eine Vielzahl an Fragmenten in unterschiedlichen Konzentrationen an einem oder mehreren Proteinsystemen zu testen und um Aussagen über die Besetzung von Xenonatomen in den jeweiligen Proteinkomplexen in Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit und -Art treffen zu können. Vor ca. 10 – 15 Jahren wäre das Sammeln und Auswerten einer so großen Anzahl an Datensätzen in kurzer Zeit undenkbar gewesen. Aber aufgrund des immensen Fortschritts sowohl in der Proteinkristallographie, als auch in der Softwareentwicklung und bei den Nutzungsmöglichkeiten von Synchrotron Strahlzeit, wodurch sich ca. 50 Datensätze an Proteinkristallen in 48 Stunden sammeln lassen, ist es heutzutage möglich, ein nahezu analytisches Screening mittels Proteinkristallographie und Röntgenstrukturanalyse durchzuführen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit befasste sich mit der Suche nach Sondenmolekülen, die sich generell auf verschiedene Proteinsysteme übertragen lassen, um deren Bindetaschen experimentell über Röntgenstrukturanalyse zu charakterisieren. Diese experimentell charakterisierten, von Fragmenten favorisierten Bindungsstellen in Proteinbindetaschen werden auch als *HotSpots* bezeichnet. Diese gefundenen *HotSpots* stellen die Grundlage dar, um einen proteinbasierten Pharmakophore abzuleiten, mit dessen Hilfe neue Leitstrukturen im Wirkstoffdesign entwickelt werden können.

Als erstes gelang es, einen Komplex des Proteins TLN mit dem Edelgas Xenon zu bestimmen. Allerdings bindet Xenon nicht in der aktiven Tasche von TLN, sondern in einer sich tief im Innern des Proteins befindenden hydrophoben Kavität. Leider war Xenon somit nicht als Sondenmolekül zum Charakterisieren von Proteinbindetaschen geeignet, aber der TLN/Xenon-Komplex wurde herangezogen, um mittels Xenon als

Schweratom die Struktur von Thermolysin zu bestimmen. In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Joel L. Sussman in Rehovot, Israel, gelang es, durch Inkorporation von Xenon in Proteinkristallen von Thermolysin und *Tc*Acetylcholinesterase die 3D-Struktur der jeweiligen Xenonproteinkomplexe über SAD (Single Anomalous Dispersion) an einer hauseigenen Röntgenquelle zu bestimmen. Zusätzlich wurden auch noch die Enzyme Endothiapepsin, TGT und Sap2 mit Xenon derivatisiert. Allerdings war es dabei nur möglich, die Struktur von Endothiapepsin über SAD mit *in house* gesammelten Daten zu bestimmen. Diese sowohl positiven als auch bis dato weniger erfolgreichen Beispiele lieferten erste Hinweise inwiefern das Bestimmen von 3D-Proteinstrukturen von der Größe des Enzyms, von der Anzahl und Population der gebundenen Xenonatom abhängig ist und welchen Einfluss die vorherrschende Raumgruppe, in der das Protein auskristallisiert, hat. Beim hoch-symmetrisch kristallisierenden Thermolysin (RG: $P6_122$; 316 Aminosäuren) reichte ein mit 81 % besetztes Xenonatom aus, um die Struktur zu bestimmen. *Tc*Acetylcholinesterase (RG: $P3_121$) stellt mit seinen 535 Resten ein sehr großes Protein dar. Zwei gebundene Xenonatom mit einer jeweiligen Besetzung von 48 % und 66 % reichten aus, um die Struktur zu bestimmen. Endothiapepsin mit 330 Aminosäuren kristallisiert in einer deutlich niedriger symmetrischen Kristallpackung (RG: $P2_1$) aus. Die Xenonbesetzung konnte auf 55 % verfeinert werden. Aufgrund der schwachen Population und der niedrigen Packungssymmetrie gelang dessen 3D-Strukturbestimmung nur sehr mühsam. Bei TGT, das ebenfalls niedrig-symmetrisch kristallisiert (RG: $C2$; 386 Aminosäuren) und 2 gebundene Xenonatom aufnimmt (Population: 25 % und 40 %) bzw. Sap2 das eine orthorhombische Packungssymmetrie im Kristallverbund bevorzugt (RG: $P2_12_12_1$; 342 Aminosäuren) und ein gebundenes Xenonatom aufweist (Population: 56 %), gelang es nicht, die Struktur mittels der SAD-Methode durch *in house* gesammelter Daten zu lösen. Nichts desto trotz konnte an Hand der Modellsystemen Thermolysin (sehr hohe Packungssymmetrie), *Tc*Acetylcholinesterase (535 Aminosäuren pro Monomer) und Endothiapepsin (Grenzfall bei der Strukturbestimmung) gezeigt werden, das die Strukturbestimmung von Proteinen unterschiedlicher Enzymklassen, Größe und Symmetrie mit Hilfe des Edelgases Xenon als Schweratomderivat durch die SAD-Methode anhand von *in house* gesammelten Daten eine einfache, toxikologisch unbedenkliche und leicht

durchzuführende Alternative zu herkömmlichen Methoden, wie z.B. Quecksilber- oder Selenmethioninderivaten, darstellt.

Bei der Suche nach Sondenmolekülen, die zur Charakterisierung und zum Ausleuchten von Proteinbindetaschen geeignet sind, wurde daraufhin über Soaking und Co-Kristallisation versucht, sehr kleine, hydrophile Moleküle in die Bindetasche der Zielproteine hinein diffundieren zu lassen. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden 25 Fragmente und Gase unterschiedlicher Größe (MW: 60 – 297 g/mol) und Eigenschaften an dem Proteinsystem TLN in verschiedenen Ligandkonzentrationen (12,5 – 100 mM) und Derivatisierungszeiten (30 s – 4 Wochen) mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse vorab durchgemustert. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnten das Bindungsverhalten von Anilin, 3-Bromphenol, 2-Bromessigsäure, 1,2-Propandiol, Harnstoff, N-Methylharnstoff und Distickstoffmonoxid im aktiven Zentrum von TLN charakterisiert werden. Diese am Beispiel von TLN erfolgreich etablierten Sondenmoleküle wurden dann auf andere Proteinsysteme übertragen. Im aktiven Zentrum von PKA konnten jeweils zwei Moleküle Phenol und N-Methylharnstoff sowie in der Bindetasche von DXI und IspD jeweils ein 1,2-Propandiolmolekül charakterisiert werden.

Diese experimentell ermittelten *HotSpots* wurden im Anschluss mit theoretisch berechneten *HotSpots* unter Verwendung des Programms DrugScore^{HotSpot} verglichen. Zur computerbasierten HotSpot-Vorhersage wurden als Sondenmoleküle die analogen funktionellen Gruppen des Fragments, wie z.B. OH-, NH₂- und Carbonylgruppen sowie aromatische und aliphatische Kohlenstoffgerüste herangezogen. Am Anfang der Arbeit zeigte sich noch eine relative große Diskrepanz zwischen den experimentell und theoretisch ermittelten HotSpots, besonders in der Gegenwart von Metallionen. Im Laufe dieser Arbeit wurden unter anderem aufgrund dieser aufgewiesenen Abweichungen die DrugScore^{HotSpot}-Potentiale von Gerd Neudert soweit verbessert, dass die theoretisch berechneten Vorhersagen von HotSpots in Proteinbindetaschen gut mit den experimentell gewonnenen Erkenntnissen übereinstimmen. Die Bestimmung von Protein/Fragment-Komplexen durch Röntgenstrukturanalyse bleibt trotz verbesserter Computerprogramme weiterhin notwendig, um bevorzugte Bindungsstellen von Liganden zu identifizieren. Allerdings stellt die Kombination beider Ansätze eine hervorragende Möglichkeit dar, proteinbasierte Pharmakophore zu erstellen und mit

Hilfe dieser neue Arzneistoffe zu entwickeln. Mit Phenol, Anilin, N-Methylharnstoff und 1,2-Propandiol wurde eine Reihe an funktionell unterschiedlichen Sondenmolekülen gefunden, die sich auf verschiedene Proteinsysteme übertragen lassen und dadurch für die experimentelle HotSpot-Analyse geeignet sind.

Als drittes und letztes Thema der Arbeit wurde am Beispiel des Enzyms 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-4-phosphat-synthase (IspD) versucht, eine neue Leitstruktur gegen Malaria und Tuberkulose zu entwickeln. Basis war hier eine Kristallstruktur mit dem Fragment 1,2-Propandiol in der Bindetasche. Dieses Molekül bindet analog zum Methylerythritol-Teil des Substrates CDPME in der Substrattasche des Enzyms. Über einen Thermofluoro-Assay und mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurde versucht, ein passendes, zum Cytidin basenanalogen Molekül zu finden, welches dann in die Basentasche von IspD binden sollte. Das Ziel dabei war es, beide Fragmente passend miteinander zu verbinden, um so eine neue hochpotente Leitstruktur gegen Malaria und Tuberkulose zu erhalten.

Obwohl die Apo-Struktur von IspD bekannt ist, stellte das Erzeugen von reproduzierbaren und für Diffraktionsexperimente tauglichen IspD-Kristallen eine besondere Herausforderung dar. Insgesamt wurden weit mehr als 1000 verschiedenen Kristallisationsbedingungen getestet. In einer Feinabstimmung der anfänglich gefunden Bedingungen bezüglich verschiedener pH-Werte, Fällungsmittel- und Additivkonzentrationen ließen sich unter der Bedingung 38 % MPD; 8 % PEG 8000, und 0,1 M Natriumcacodylat bei pH 6,5 reproduzierbare und ausreichend streuende Kristalle erhalten. Das Streuverhalten von *in house* vermessenen IspD-Kristallen konnte von einer anfänglichen Auflösung von 4,0 Å bis hin zu 2,34 Å verbessert werden.

Aufgrund des hohen Proteinverbrauchs bei der Durchführung des Thermofluoro-Assays und der Findung neuer reproduzierbarer Kristallisationsbedingungen wurde das bestehende Expressions- und Reinigungsprotokoll bezüglich der Ausbeute an IspD weiter verbessert. Die Ausbeute an IspD konnte von 135 mg auf 208 mg IspD pro 4 l Ansatz gesteigert werden.

Durch einen Thermofluoro-Assay wurden bisher 24 entweder gekaufte oder auch hauseigene Substanzen durchgemustert, um eine Vorauswahl an Fragmenten für die Röntgenstrukturanalyse zu finden. Um eine bessere Aussage über die Güte der im

Thermofluoro-Assay erhaltenen Werte treffen zu können, wurden alle Substanzen jeweils drei Mal in einer Konzentration von 10 mM gegen das Enzym IspD vermessen. Bei diesen Messungen kristallisierten sich die Liganden 6, 18, 20, 22, 23 und 24 mit einer Schmelzpunktverschiebung von $2^{\circ} - 7,5^{\circ} \text{ C}$ als sehr vielversprechend heraus. Die im Zuge dieser Arbeit verbesserten Kristallisationsbedingungen für IspD sollten es ermöglichen, in Zukunft das Bindungsverhalten der im Thermofluoro-Assay aufgefallenen Fragmente röntgenkristallographisch aufzuklären. Weiter ist es gelungen, eine IspD-Struktur in Komplex mit 1,2-Propandiol zu bestimmen und in der PDB zu deponieren. Dieses ist der erste in der PDB veröffentlichte IspD-Komplex, bei der ein anderes Molekül als dem Substrat CDPME oder eines der davon ableitbaren Bruchstücke ME, CDP und CTP in der Bindetasche ausfindig gemacht werden konnte.

8 Literatur

- Abad-Zapatero, C., Goldman, R., Muchmore, S., W. , Hutchins, C., Stewart, K., Navaza, J., Payne, C., D. and Ray, T., L. (1996). "Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: Implications for the design of antifungal agents." Protein Science **5**(4): 640-652.
- Abad-Zapatero, C. and Metz, J. T. (2005). "Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery." Drug Discovery Today **10**(7): 464-469.
- Abrahams, J. P. and Leslie, A. G. W. (1996). "Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F₁ ATPase." Acta Crystallographica Section D **52**(1): 30-42.
- Allen, K. N., Bellamacina, C. R., Ding, X., Jeffrey, C. J. and Mattos, C. (1996). "An Experimental Approach to Mapping the Binding Surfaces of Crystalline Proteins." The Journal of Physical Chemistry **100**(7): 2605 - 2611.
- Allen, K. N., Lavie, A., Glasfeld, A., Tanada, T. N., Gerrity, D. P., Carlson, S. C., Farber, G. K., Petsko, G. A. and Ringe, D. (1994). "Role of the Divalent Metal Ion in Sugar Binding, Ring Opening, and Isomerization by D-Xylose Isomerase: Replacement of a Catalytic Metal by an Amino Acid." Biochemistry **33**(6): 1488-1494.
- Badger, J., Sauder, J. M., Adams, J. M., Antonysamy, S., Bain, K., Bergseid, M. G., Buchanan, S. G., Buchanan, M. D., Batiyenko, Y., Christopher, J. A., Emtage, S., Eroshkina, A., Feil, I., Furlong, E. B., Gajiwala, K. S., Gao, X., He, D., Hendle, J., Huber, A., Hoda, K., Kearins, P., Kissinger, C., Laubert, B., Lewis, H. A., Lin, J., Loomis, K., Lorimer, D., Louie, G., Maletic, M., Marsh, C. D., Miller, I., Molinari, J., Muller-Dieckmann, H. J., Newman, J. M., Noland, B. W., Pagarigan, B., Park, F., Peat, T. S., Post, K. W., Radojicic, S., Ramos, A., Romero, R., Rutter, M. E., Sanderson, W. E., Schwinn, K. D., Tresser, J., Winhoven, J., Wright, T. A., Wu, L., Xu, J. and Harris, T. J. R. (2005). "Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **60**(4): 787-796.
- Banbula, A., Potempa, J., Travis, J., Fernandez-Catalén, C., Mann, K., Huber, R., Bode, W. and Medrano, F. J. (1998). "Amino-acid sequence and three-dimensional structure of the Staphylococcus aureus metalloproteinase at 1.72 Å resolution." Structure **6**(9): 1185-1193.
- Banerjee, S., Archana, A. and Satyanarayana, T. (1994). "Xylose metabolism in a thermophilic mold Malbranchea pulchella var. sulfurea Tmd-8." Current Microbiology **29**: 349-352.

- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, J. E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977). "The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures." Journal of Molecular Biology **112**(3): 535-542.
- Bijvoet, J. M. (1949). Proc. Acad. Sci. Amst. **52**: 313-314.
- Blum, A. (2007). Strukturbasiertes Design und Synthese von Pyrrolidinen als Inhibitoren der HIV-1-Protease. Ph D Thesis, Philipps-University Marburg.
- Blum, A., Böttcher, J., Heine, A., Klebe, G. and Diederich, W. E. (2008). "Structure-Guided Design of C2-Symmetric HIV-1 Protease Inhibitors Based on a Pyrrolidine Scaffold." Journal of Medicinal Chemistry **51**(7): 2078-2087.
- Blundell, T. L., Jenkins, J. A., Sewell, B. T., Pearl, L. H., Cooper, J. B., Tickle, I. J., Veerapandian, B. and Wood, S. P. (1990). "X-ray analyses of aspartic proteinases : The three-dimensional structure at 2.1 Å resolution of endothiapepsin." Journal of Molecular Biology **211**(4): 919-941.
- Blundell, T. L. and Johnson, L. N. (1976). Protein Crystallography.
- Bokhoven, C., Schoone, J. C. and Bijvoet, J. M. (1951). "The Fourier synthesis of the crystal structure of strychnine sulphate pentahydrate." Acta Crystallographica **4**(3): 275-280.
- Booth, B. A., Boesman-Finkelstein, M. and Finkelstein, R. A. (1983). "Vibrio cholerae soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme." Infection and Immunity **42**(2): 639-644.
- Bor, Y.-C., Moraes, C., Lee, S.-P., Crosby, W. L., Sinskey, A. J. and Batt, C. A. (1992). "Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* gene encoding xylose isomerase." Gene **114**(1): 127-132.
- Böttcher, J., Blum, A., Dörr, S., Heine, A., Diederich, W., E. and Klebe, G. (2008). "Targeting the Open-Flap Conformation of HIV-1 Protease with Pyrrolidine-Based Inhibitors." ChemMedChem **3**(9): 1337-1344.
- Bourne, Y., Grassi, J., Bougis, P. E. and Marchot, P. (1999). "Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography." Journal of Biological Chemistry **274**(43): 30370-30376.
- Bourne, Y., Taylor, P. and Marchot, P. (1995). "Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex." Cell **83**(3): 503-512.
- Brenk, R. (2002). Virtuelles Screening, strukturbasiertes Design und Kristallstrukturanalyse von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase, ein Target der Bakterienruhr. Ph D Thesis, Philipps-University Marburg.

- Broach, J. R. and Thorner, J. (1996). "High-throughput screening for drug discovery." Nature **384**(6604, suppl.): 14-16.
- Brown, D. and Superti-Furga, G. (2003). "Rediscovering the sweet spot in drug discovery." Drug Discovery Today **8**(23): 1067-1077.
- Brunger, A. T. (1998). "Crystallography and NMR System (CNS): a new software system for macromolecular structure determination." Acta Crystallog. D **54**: 905-921.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W. and De Bruyne, C. K. (1988). "D-Xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*: Structural and catalytic roles of bivalent metal ions." Enzyme and Microbial Technology **10**(11): 695-700.
- Carlson, C. R., Witczak, O., Vossebein, L., Labbe, J.-C., Skalhegg, B. S., Keryer, G., Herberg, F. W., Collas, P. and Tasken, K. (2001). "CDK1-mediated phosphorylation of the RII α regulatory subunit of PKA works as a molecular switch that promotes dissociation of RII α from centrosomes at mitosis." Journal of Cell Science **114**(18): 3243-3254.
- Carr, R. and Jhoti, H. (2002). "Structure-based screening of low-affinity compounds." Drug Discovery Today **7**(9): 522-527.
- Carrell, H. L., Hoier, H. and Glusker, J. P. (1994). "Modes of binding substrates and their analogues to the enzyme d-xylose isomerase." Acta Crystallographica Section D **50**(2): 113-123.
- Carrell, H. L., Rubin, B. H., Hurley, T. J. and Glusker, J. P. (1984). "X-ray crystal structure of D-xylose isomerase at 4-Å resolution." Journal of Biological Chemistry **259**(5): 3230-3236.
- Chang, C., Park, B. C., Lee, D.-S. and Suh, S. W. (1999). "Crystal structures of thermostable xylose isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: possible structural determinants of thermostability." Journal of Molecular Biology **288**(4): 623-634.
- Chen, W. P., Anderson, A. W. and Han, Y. W. (1979). "Extraction of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*." Applied and Environmental Microbiology **37**(4): 785-787.
- Cohen, A., Ellis, P., Kresge, N. and Soltis, M. S. (2001). "MAD phasing with krypton." Acta Crystallographica Section D **57**(2): 233-238.

- Collaborative Computational Project Number, n. (1994). "Collaborative Computational Project Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography." Acta Crystallographica Section D **50**: 760.
- Congreve, M., Carr, R., Murray, C. and Jhoti, H. (2003). "A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery?" Drug Discovery Today **8**(19): 876-877.
- Cooper, J., Foundling, S., Hemmings, A., Blundell, T., Jones, M., D. , Hallett, A. and Szelke, M. (1987). "The structure of a synthetic pepsin inhibitor complexed with endothiapepsin." European Journal of Biochemistry **169**(1): 215-221.
- Cowtan, K. D. and Zhang, K. Y. J. (1999). "Density modification for macromolecular phase improvement " Progress in Biophysics and Molecular Biology **72**(3): 245.
- Cummings, M. D., Farnum, M. A. and Nelen, M. I. (2006). "Universal Screening Methods and Applications of ThermoFluor®." Journal of Biomolecular Screening **11**(7): 854-863.
- Dauter, Z., Dauter, M. and Dodson, E. (2002). "Jolly SAD." Acta Crystallographica Section D **58**(3): 494-506.
- Davies, D. R. (1990). "The Structure and Function of the Aspartic Proteinases." Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry **19**(1): 189-215.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P. (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." Journal of Biological Chemistry **351**(1): 95-105.
- de La Fortelle, E. and Bricogne, G. (1997). "Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods." Methods Enzymol. **276**: 472-494.
- Delfino, R. T., Ribeiro, T. S. and Figueroa-Villar, J. D. (2009). "Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review." Journal of the Brazilian Chemical Society **20**: 407-428.
- Drucker, H. and Borchers, S. L. (1971). "The role of calcium in thermolysin: Effect on kinetic properties and autodigestion." Archives of Biochemistry and Biophysics **147**(1): 242-248.
- Dubendorff, J. W. and Studier, F. W. (1991). "Creation of a T7 autogene : Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter." Journal of Molecular Biology **219**(1): 61-68.
- Durand, J., M. B., Dagberg, B., Uhlin, B. E. and Björk, G., R. (2000). "Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the

- regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene." Molecular Microbiology **35**(4): 924-935.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. and Rohdich, F. (2004). "Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway." Cellular and Molecular Life Sciences **61**(12): 1401-1426.
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M. H. and Bacher, A. (1998). "The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms." Chemistry & Biology **5**(9): R221-R233.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallographica Section D **60**: 2126.
- English, A. C., Groom, C. R. and Hubbard, R. E. (2001). "Experimental and computational mapping of the binding surface of a crystalline protein." Protein Engineering **14**(1): 47-59.
- Erlanson, K. A., Park, J.-H., Wissam, El, K., Kao, H.-H., Basaran, P., Brydges, S. and Batt, C. A. (2000). "Dissolution of Xylose Metabolism in *Lactococcus lactis*." Applied and Environmental Microbiology **66**(9): 3974-3980.
- Erlanson, D. A., McDowell, R. S. and O'Brien, T. (2004). "Fragment-Based Drug Discovery." Journal of Medicinal Chemistry **47**(14): 3463-3482.
- Feldmann, S. D., Sahm, H. and Sprenger, G. A. (1992). "Cloning and expression of the genes for xylose isomerase and xylulokinase from *Klebsiella pneumoniae* 1033 in *Escherichia coli* K12." Molecular Genetics and Genomics **234**(2): 201-210.
- Gaikwad, S., Rao, M. and Deshpande, V. (1993). "Structure-function relationship of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*: Evidence for the occurrence of inactive dimer." Enzyme and Microbial Technology **15**(2): 155-157.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2003). "ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." Nucleic Acids Research **31**(13): 3784-3788.
- Geschwindner, S., Olsson, L.-L., Albert, J. S., Deinum, J., Edwards, P. D., de Beer, T. and Folmer, R. H. A. (2007). "Discovery of a Novel Warhead against β -Secretase through Fragment-Based Lead Generations." Journal of Medicinal Chemistry **50**(24): 5903-5911.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Analytical Biochemistry **182**(2): 319-326.

- Gjertsen, B. T. and Døskeland, S. O. (1995). "Protein phosphorylation in apoptosis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1269**(2): 187-199.
- Gohlke, H., Hendlich, M. and Klebe, G. (2000). "Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions." Journal of Molecular Biology **295**(2): 337-356.
- Gonzalez, A., Pedelacq, J. D., Sola, M., Gomis-Ruth, F. X., Coll, M., Samama, J. P. and Benini, S. (1999). "Two-wavelength MAD phasing: in search of the optimal choice of wavelengths." Acta Crystallographica Section D **55**(8): 1449-1458.
- Goodford, P. J. (1985). "A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules." Journal of Medicinal Chemistry **28**(7): 849-857.
- Gruber, A., Speth, C., Lukasser-Vogl, E., Zangerle, R., Borg-von Zepelin, M., Dierich, M. P. and Würzner, R. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor attenuates *Candida albicans* virulence properties in vitro." Immunopharmacology **41**(3): 227-234.
- Hajduk, P. J. and Greer, J. (2007). "A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned." Nat. Rev. Drug Discovery **6**(3): 211.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T., L., Mallender, W., D., Lewis, T., Fletcher, R., J., Guss, J. M., Silman, I. and Sussman, J., L. (2000). "Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors." Protein Science **9**(6): 1063-1072.
- Harrison, R. K., Chang, B., Niedzwiecki, L. and Stein, R. L. (1992). "Mechanistic studies on the human matrix metalloproteinase stromelysin." Biochemistry **31**(44): 10757-10762.
- Hasinoff, B. B. (1982). "Kinetics of acetylthiocholine binding to electric eel acetylcholinesterase in glycerol/water solvents of increased viscosity Evidence for a diffusion-controlled reaction." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **704**(1): 52-58.
- Hendlich, M., Bergner, A., Günther, J. and Klebe, G. (2003). "Relibase: Design and Development of a Database for Comprehensive Analysis of Protein-Ligand Interactions." Journal of Molecular Biology **326**(2): 607-620.
- Hendrickson, W. A., Horton, J. R. and LeMaster, D. M. (1990). "Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure." EMBO J. **9**(5): 1665-1672.

- Hendrickson, W. A. and Teeter, M. M. (1981). "Structure of the hydrophobic protein crambin determined directly from the anomalous scattering of sulphur." Nature **290**(5802): 107-113.
- Herrmann, G., Selmer, T., Jessen, H., J. , Gokarn, R., R. , Selifonova, O., Gort , S., J. and Buckel, W. (2005). "Two beta-alanyl-CoA:ammonia lyases in *Clostridium propionicum*." FEBS Journal **272**(3): 813-821.
- Hochster, R. M. and Watson, R. W. (1954). "Enzymatic isomerization of D-xylose to D-xylulose." Archives of Biochemistry and Biophysics **48**(1): 120-129.
- Hohwy, M., Spadola, L., Lundquist, B., Hawtin, P., Dahmén, J., Groth-Clausen, I., Nilsson, E., Persdotter, S., von Wachenfeldt, K., Folmer, R. H. A. and Edman, K. (2008). "Novel Prostaglandin D Synthase Inhibitors Generated by Fragment-Based Drug Design " Journal of Medicinal Chemistry **51**(7): 2178-2186.
- Holden, H. M. and Matthews, B. W. (1988). "The binding of L-valyl-L-tryptophan to crystalline thermolysin illustrates the mode of interaction of a product of peptide hydrolysis." Journal of Biological Chemistry **263**(7): 3256-3260.
- Holland, D. R., Tronrud, D. E., Pley, H. W., Flaherty, K. M., Stark, W., Jansonius, J. N., McKay, D. B. and Matthews, B. W. (1992). "Structural comparison suggests that thermolysin and related neutral proteases undergo hinge-bending motion during catalysis." Biochemistry **31**(46): 11310-11316.
- Holmes, M. A. and Matthews, B. W. (1982). "Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution." Journal of Molecular Biology **160**(4): 623-639.
- Hope, H. (1988). "Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method." Acta Crystallographica Section B **44**(1): 22-26.
- Hopkins, A. L., Groom, C. R. and Alex, A. (2004). "Ligand efficiency: a useful metric for lead selection." Drug Discovery Today **9**(10): 430-431.
- Houghton, P. J., Ren, Y. and Howes, M.-J. (2006). "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi." Natural Product Reports **23**(2): 181-199.
- Hubbard, M. J. and Cohen, P. (1993). "On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation." Trends in Biochemical Sciences **18**(5): 172-177.
- Huggenvik, J. I., Collard, M. W., Stofko, R. E., Seasholtz, A. F. and Uhler, M. D. (1991). "Regulation of the Human Enkephalin Promoter by Two Isoforms of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase." Mol Endocrinol **5**(7): 921-930.
- James, R. (1954). "Optical Principles of the Diffraction of X-Rays." **2**.

- Jencks, W. P. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**: 4046.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D. and Beck, E. (1999). "Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs." Science **285**(5433): 1573-1576.
- Kabsch, W. (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." Journal of Applied Crystallography **26**(6): 795-800.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. and Phillips, D. C. (1958). "A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis." Nature **181**(4610): 662-666.
- Kester, W. R. and Matthews, B. W. (1977). "Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: implications for the mechanism of catalysis." Biochemistry **16**(11): 2506-2516.
- Knighton, D. R., Bell, S. M., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Xuong, N., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. (1993). "2.0 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with a peptide inhibitor and detergent." Acta Crystallographica Section D **49**(3): 357-361.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. (1991). "Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Science **253**(5018): 414-420.
- Koelsch, G., Tang, J., Loy, J. A., Monod, M., Jackson, K., Foundling, S. I. and Lin, X. (2000). "Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1480**(1-2): 117-131.
- Kristo, P., Saarelainen, R., Fagerström, R., Aho, S. and Korhola, M. (1996). "Protein Purification, and Cloning and Characterization of the cDNA and Gene for Xylose Isomerase of Barley." European Journal of Biochemistry **237**(1): 240-246.
- Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toker, L., Velan, B., Lazar, A., Kronman, C., Barak, D., Ariel, N., Shafferman, A., Silman, I. and Sussman, J. L. (2000). "Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculatin-II." Acta Crystallographica Section D **56**(11): 1385-1394.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambeir, A. M., Lauwereys, M., Stanssens, P., Mrabet, N. T., Snauwaert, J., Van Tilbeurgh, H., Matthyssens, G., Lasters, I. and De Maeyer, M. (1992). "Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 2. Site-directed mutagenesis of the xylose binding site." Biochemistry **31**(24): 5459-5466.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." J. Appl. Crystallog. **26**: 283-291.
- Lawlis, V. B., Dennis, M. S., Chen, E. Y., Smith, D. H. and Henner, D. J. (1984). "Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose kinase genes of *Escherichia coli*." Appl. Environ. Microbiol. **47**(1): 15-21.
- Lawrence, J. H., Loomis, W. F., Tobias, C. A. and Turpin, F. H. (1946). "Preliminary observations on the narcotic effect of xenon with a review of values for solubilities of gases in water and oils." Journal of Physiology **195**: 197-204.
- Lepre, C. A., Moore, J. M. and Peng, J. W. (2004). Chem. Rev. **104**: 3641.
- Lichtenthaler, H. K. (1999). "The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**(1): 47-65.
- Lichtenthaler, H. K. (2000). "Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors." Biochem. Soc. Trans. **28**(6): 785-789.
- Lipinski, C. A. (2004). Drug Discovery Today **1**: 341.
- Lipinski, C. A. (2000). "Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability." Journal of Pharmacological and Toxicological Methods **44**(1): 235-249.
- Liu, S. Y., Wiegel, J. and Gherardini, F. C. (1996). "Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489." J. Bacteriol. **178**(20): 5938-5945.
- Lönn, A., Träff-Bjerre, K. L., Cordero Otero, R. R., van Zyl, W. H. and Hahn-Hägerdal, B. (2003). "Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xyIA* from *Thermus thermophilus*." Enzyme and Microbial Technology **32**(5): 567-573.

- Machius, M., Henry, L., Palnitkar, M. and Deisenhofer, J. (1999). "Crystal structure of the DNA nucleotide excision repair enzyme UvrB from *Thermus thermophilus*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(21): 11717-11722.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." Science **298**(5600): 1912-1934.
- Matthews, B. W. (1972). "The γ -Turn. Evidence for a New Folded Conformation in Proteins." Macromolecules **5**(6): 818-819.
- McDonnell, J. M. (2001). "Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition " Curr. Opin. Chem. Biol. **5**(5): 572-577.
- McPherson, A. (1999). "Crystallization of Biological Macromolecules." Cold Spring Harbor Laboratory Press **2nd**.
- Meaden, P. G., Aduse-Opoku, J., Reizer, J., Reizer, A., Lanceman, Y. A., Martin, M. F. and Mitchell, W. J. (1994). "The xylose isomerase-encoding gene (*xyIA*) of *Clostridium thermosaccharolyticum*: cloning, sequencing and phylogeny of *xyIA* enzymes." Gene **141**(1): 97-101.
- Metz, G., Otleben, H. and Vetter, D., Eds. (2003). Methods and Principles in Medicinal Chemistry.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D. and Sanglard, D. (1998). "Differential regulation of SAP8 and SAPS, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*." Microbiology **144**(10): 2731-2737.
- Moriwara, K. (1967). "The specificities of various neutral and alkaline proteinases from microorganisms." Biochemical and Biophysical Research Communications **26**(6): 656-661.
- Mueller-Dieckmann, C., Panjikar, S., Tucker, P. A. and Weiss, M. S. (2005). "On the routine use of soft X-rays in macromolecular crystallography. Part III. The optimal data-collection wavelength." Acta Crystallographica Section D **61**(9): 1263-1272.
- Mueller, M. (2002). Molekular-Dynamik-Simulationen zum Katalyse-Mechanismus der Acetylcholinesterase. Ph D Thesis, Georg-August-Universität Göttingen.
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J. and Hube, B. (2003). "*Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis." Microbiology and Molecular Biology Reviews. **67**(3): 400-428.

- Nettleship, J. E., Brown, J., Groves, M. R. and Geerlof, A. (2008). Methods for Protein Characterization by Mass Spectrometry, Thermal Shift (ThermoFluor) Assay, and Multiangle or Static Light Scattering. Structural Proteomics: 299-318.
- Nienaber, V. L., Richardson, P. L., Klighofer, V., Bouska, J. J., Giranda, V. L. and Greer, J. (2000). "Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening." Nature Biotechnology. **18**(10): 1105-1108.
- Niesen, F. H., Berglund, H. and Vedadi, M. (2007). "The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability." Nature Protocols **2**(9): 2212-2221.
- Nolte, H.-J., Rosenberry, T. L. and Neumann, E. (1980). "Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands." Biochemistry **19**(16): 3705-3711.
- Nordberg, A. (2006). "Mechanisms Behind the Neuroprotective Actions of Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer Disease." Alzheimer Disease & Associated Disorders **20**: 12-18.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. and Goldman, A. (1992). "The α/β -hydrolase fold." Protein Engineering. **5**(3): 197-211.
- Oprea, T. I., Davis, A. M., Teague, S. J. and Leeson, P. D. (2001). J. Chem. Inf. Comput. Sci. **41**: 1308.
- Orts, J., Tuma, J., Reese, M., Grimm, S. K., Monecke, P., Bartoschek, S., Schiffer, A., Wendt, K. U., Griesinger, C. and Carlomagno, T. (2008). "Crystallography-Independent Determination of Ligand Binding Modes13." Angewandte Chemie International Edition **47**(40): 7736-7740.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." Methods in Enzymology **276**: 307-326.
- Pape, T. and Schneider, T. R. (2004). "*HKL2MAP*: a graphical user interface for macromolecular phasing with *SHELX* programs." Journal of Applied Crystallography **37**(5): 843-844.
- Park, J.-H. and Batt, C. A. (2004). "Restoration of a Defective *Lactococcus lactis* Xylose Isomerase." Applied and Environmental Microbiology. **70**(7): 4318-4325.

- Patchett, A., A. and Cordes, E., H. (2006). The Design and Properties of N-Carboxyalkyldipeptide Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. Alton, M.: 1-84.
- Pearl, L. H. and Blundell, T. L. (1984). FEBS Lett. **174**: 96.
- Perrakis, A., Morris, R. and Lamzin, V. S. (1999). "Automated protein model building combined with iterative structure refinement." Nature Structural Molecular Biology. **6**(5): 458-463.
- Pichová, I., Pavlíková, L., Dostá, J. í., I, Dolejsi, E., Hrusková-Heidingsfeldová, O., Weber, J., Ruml, T. and Soucek, M. (2001). "Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*." European Journal of Biochemistry **268**(9): 2669-2677.
- Prangé, T., Schiltz, M., Pernot, L., Colloc'h, N., Longhi, S., Bourguet, W. and Fourme, R. (1998). "Exploring hydrophobic sites in proteins with xenon or krypton." Proteins: Structure, Function, and Genetics **30**(1): 61-73.
- Quillin, M. L., Breyer, W. A., Griswold, I. J. and Matthews, B. W. (2000). "Size versus polarizability in protein-ligand interactions: binding of noble gases within engineered cavities in phage T4 lysozyme." Journal of Molecular Biology **302**(4): 955-977.
- Ramachandran, G. N. and Raman, S. (1956). "A New Method for the Structure Analysis of Non-Centrosymmetric Crystals." Current Science **25**: 348-351.
- Rangarajan, M., Asboth, B. and Hartley, B. S. (1992). "Stability of *Arthrobacter* D-xylose isomerase to denaturants and heat." Biochem J. **285**(3): 889-898.
- Rasmussen, H., Cour, T. I., Nyborg, J. and Schulein, M. (1994). "Crystallization and preliminary investigation of xylose isomerase from *Bacillus coagulans*." Acta Crystallographica Section D **50**(2): 231-233.
- Rees, D. C., Congreve, M., Murray, C. W. and Carr, R. (2004). Nat. Rev. Drug Discovery **3**: 660.
- Richard, S. B., Bowman, M. E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A. M., Cane, D. E. and Noel, J. P. (2001). "Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthetase involved in mevalonate-independent isoprenoid biosynthesis." Nature Structural Molecular Biology **8**(7): 641-648.
- Ripoll, D. R., Faerman, C. H., Axelsen, P. H., Silman, I. and Sussman, J. L. (1993). "An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase." PNAS **90**(11): 5128-5132.

- Ritschel, T. (2009). TGT a Drug Target to Study pKa Shifts, Residual Solvation & Protein - Protein Interface Formation. Ph D Thesis, Philipps-University Marburg.
- Rodgers, D. W. (1994). "Cryocrystallography." Structure **2**(12): 1135-1140.
- Rohmer, M. (1999). "The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants." Natural Product Reports **16**: 565-574.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. and Sahm, H. (1993). "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate." Biochem J. **295**: 517-524.
- Romier, C., Ficner, R., Reuter, K. and Suck, D. (1996). "Purification, crystallization, and preliminary x-ray diffraction studies of tRNA-guanine transglycosylase from *Zymomonas mobilis*." Proteins **24**(4): 516-519.
- Romier, C., Meyer, J. E. W. and Suck, D. (1997). "Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms." FEBS Letters **416**(1): 93-98.
- Romier, C., Reuter, K., Suck, D. and Ficner, R. (1996). "Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange." EMBO J. **15**(11): 2850-2857.
- Rossmann, M. (1961). "The position of anomalous scatterers in protein crystals." Acta Crystallographica **14**(4): 383-388.
- Sambrock, J. (1989). "Molecular cloning. ." A Laboratory Manual **2**.
- Schechter, I. and Berger, A. (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." Biochemical and Biophysical Research Communications **27**(2): 157-162.
- Schiltz, M., Fourme, R., Broutin, I. and Prangé, T. (1995). "The catalytic site of serine proteinases as a specific binding cavity for xenon." Structure **3**(3): 309-316.
- Schiltz, M., Prange, T. and Fourme, R. (1994). "On the preparation and X-ray data collection of isomorphous xenon derivatives." Journal of Applied Crystallography **27**(6): 950-960.
- Schoenborn, B. P., Featherstone, R. M., Silvio, G. and Parkhurst, A. S. (1967). "Molecular Forces in Anesthesia." Advances in Pharmacology **Volume 5**: 1-2, 2A, 2B, 3-17.

- Schoenborn, B. P., Watson, H. C. and Kendrew, J. C. (1965). "Binding of Xenon to Sperm Whale Myoglobin." Nature **207**(4992): 28-30.
- Sheldrick, G. (2008). "A short history of SHELX." Acta Crystallographica Section A **64**(1): 112-122.
- Sheldrick, G. M., Schneider, T. R., Charles, W. C. J. and Robert, M. S. (1997). "SHELXL: high-resolution refinement." Methods in Enzymology: 319-343.
- Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. and Fesik, S. W. (1996). "Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR." Science **274**(5292): 1531-1534.
- Sizemore, C., Buchner, E., Rygus, T., Witke, C., Götz, F. and Hillen, W. (1991). "Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon." Molecular Genetics and Genomics. **227**(3): 377-384.
- Smith, A., W. , Chahal, B. and French, G., L. (1994). "The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*." Molecular Microbiology **13**(1): 153-160.
- Smith, F. D., Langeberg, L. K. and Scott, J. D. (2006). "The where's and when's of kinase anchoring." Trends in Biochemical Sciences **31**(6): 316-323.
- Smith, J. A., Francis, S. H. and Corbin, J. D. (1993). "Autophosphorylation: a salient feature of protein kinases." Molecular and Cellular Biochemistry **127**(1): 51-70.
- Soltis, S. M., Stowell, M. H. B., Wiener, M. C., Phillips, G. N. and Rees, D. C. (1997). "Successful flash-cooling of xenon-derivatized myoglobin crystals." Journal of Applied Crystallography **30**(2): 190-194.
- Staib, P., Lermann, U., Blaß-Warmuth, J., Degel, B., Wurzner, R., Monod, M., Schirmeister, T. and Morschhauser, J. (2008). "Tetracycline-Inducible Expression of Individual Secreted Aspartic Proteases in *Candida albicans* Allows Isoenzyme-Specific Inhibitor Screening." Antimicrob. Agents Chemother. **52**(1): 146-156.
- Stark, W., Paupit, R., A. , Wilson, K., S. and Jansonius, J., N. (1992). "The structure of neutral protease from *Bacillus cereus* at 0.2 nm resolution." European Journal of Biochemistry **207**(2): 781-791.
- Stengl, B. (2006). Structural and Functional Studies of tRNA-Guanine Transglycosylase: A putative Drug Target of Shigellosis Therapy. Ph D Thesis, Philipps-University Marburg.

- Stengl, B., Meyer, E. A., Heine, A., Brenk, R., Diederich, F. and Klebe, G. (2007). "Crystal Structures of tRNA-guanine Transglycosylase (TGT) in Complex with Novel and Potent Inhibitors Unravel Pronounced Induced-fit Adaptations and Suggest Dimer Formation Upon Substrate Binding." Journal of Molecular Biology **370**(3): 492-511.
- Stengl, B., Reuter, K. and Klebe, G. (2005). "Mechanism and Substrate Specificity of tRNA-Guanine Transglycosylases (TGTs): tRNA-Modifying Enzymes from the Three Different Kingdoms of Life Share a Common Catalytic Mechanism." ChemBioChem **6**(11): 1926-1939.
- Storoni, L. C., McCoy, A. J. and Read, R. J. (2004). Acta Crystallogr. D **60**(3): 432.
- Stowell, M. H. B., Soltis, S. M., Kisker, C., Peters, J. W., Schindelin, H., Rees, D. C., Cascio, D., Beamer, L., Hart, P. J., Wiener, M. C. and Whitby, F. G. (1996). "A simple device for studying macromolecular crystals under moderate gas pressures (0.1-10 MPa)." Journal of Applied Crystallography **29**(5): 608-613.
- Stroud, R. M. (1974). "A family of protein-cutting proteins." Scientific American **231**: 74-88.
- Suguna, K., Padlan, E. A., Smith, C. W., Carlson, W. D. and Davies, D. R. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**: 7009.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. and Silman, I. (1991). "Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein." Science **253**(5022): 872-879.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Varon, L., Toker, L., Futerman, A. H. and Silman, I. (1988). "Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C." Journal of Molecular Biology **203**(3): 821-823.
- Sussman, J. L., Harel, M. and Silman, I. (1993). "Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs." Chemico-Biological Interactions **87**(1-3): 187-197.
- Tang, J., James, M. N. G., Hsu, I. N., Jenkins, J. A. and Blundell, T. L. (1978). "Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases." Nature **271**: 618-621.
- Taskén, K., Skåhegg, B. S., Solberg, R., Andersson, K. B., Taylor, S. S., Lea, T., Blomhoff, H. K., Jahnsen, T. and Hansson, V. (1993). "Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes." Journal of Biological Chemistry **268**(28): 21276-21283.

- Taylor, P. and Lappi, S. (1975). "Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. Site and specificity of propidium binding." Biochemistry **14**(9): 1989-1997.
- Taylor, P. and Radic, Z. (1994). "The Cholinesterases: From Genes to Proteins." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **34**(1): 281-320.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. and Yonemoto, W. (1990). "Camp-Dependent Protein Kinase: Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes." Annual Review of Biochemistry **59**(1): 971-1005.
- Teague, S. J., Davis, A. M., Leeson, P. D. and Oprea, T. (1999). Angew. Chem., Int. Ed. **38**: 3743.
- Thayer, M. M., Flaherty, K. M. and McKay, D. B. (1991). "Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution." Journal of Biological Chemistry **266**(5): 2864-2871.
- Tilton, R. F., Kuntz, I. D. and Petsko, G. A. (1984). "Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin xenon complex solved to 1.9 Å." Biochemistry **23**(13): 2849-2857.
- Tilton, R. J. (1988). "A fixture for X-ray crystallographic studies of biomolecules under high gas pressure." Journal of Applied Crystallography **21**(1): 4-10.
- Tripos SYBYL 7.3., Tripos International 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- Uhler, M. D., Chrivia, J. C. and McKnight, G. S. (1986). "Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase." Journal of Biological Chemistry **261**(33): 15360-15363.
- Varsani, L., Cui, T., Rangarajan, M., Hartley, B. S., Goldberg, J., Collyer, C. and Blow, D. M. (1993). "Arthrobacter D-xylose isomerase: protein-engineered subunit interfaces." Biochemical Journal **291**(2): 575-583.
- Velec, H. F. G., Gohlke, H. and Klebe, G. (2005). "DrugScoreCSDKnowledge-Based Scoring Function Derived from Small Molecule Crystal Data with Superior Recognition Rate of Near-Native Ligand Poses and Better Affinity Prediction." Journal of Medicinal Chemistry **48**(20): 6296-6303.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C. and Taylor, R. (1999). "SuperStar: A Knowledge-based Approach for Identifying Interaction Sites in Proteins." Journal of Molecular Biology **289**(4): 1093-1108.

- Vieille, C., Epting, K., L., Kelly, R., M. and Zeikus, J. G. (2001). "Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase." European Journal of Biochemistry **268**(23): 6291-6301.
- Vitali, J., Robbins, A. H., Almo, S. C. and Tilton, R. F. (1991). "Using xenon as a heavy atom for determining phases in sperm whale metmyoglobin." Journal of Applied Crystallography **24**(5): 931-935.
- Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. and Bricogne, G. (2007). "Automated structure solution with autoSHARP." Methods in Enzymology **364**: 215 - 230.
- Walters, W. P., Stahl, M. T. and Murcko, M. A. (1998). "Virtual screening - an overview." Drug Discovery Today **3**(4): 160-178.
- Wang, B.-C., Wyckoff, H. W., Hirs, C. H. W. and Timasheff, S., N. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 115**: 90-112.
- Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F. and Hwang, J. K. (1989). "How do serine proteases really work?" Biochemistry **28**(9): 3629-3637.
- White, T. C. and Agabian, N. (1995). "Candida albicans secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors." J. Bacteriol. **177**(18): 5215-5221.
- White, T. C., Miyasaki, S. H. and Agabian, N. (1993). "Three distinct secreted aspartyl proteinases in Candida albicans." The Journal of Bacteriology. **175**(19): 6126-6133.
- Whitlow, M., Howard, A., J., Finzel, B., C., Poulos, T., L., Winborne, E. and Gilliland, G. L. (1991). "A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* structure with xylitol and D-xylose." Proteins: Structure, Function, and Genetics **9**(3): 153-173.
- Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P. and Gearing, A. J. H. (1999). "Design and Therapeutic Application of Matrix Metalloproteinase Inhibitors." Chemical Reviews **99**(9): 2735-2776.
- Wood, J. M., Schnell, C. R., Cumin, F., Menard, J. I. and Webb, R. L. (2005). "Aliskiren, a novel, orally effective renin inhibitor, lowers blood pressure in marmosets and spontaneously hypertensive rats." Journal of Hypertension **23**(2): 417-426.
- Xie, W., Liu, X. and Huang, R. (2003). "Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate." Nature Structural Molecular Biology **10**: 781-788.

- Zheng, J., Knighton, D. R., Parello, J., Taylor, S. S., Sowadski, J. M., Tony, H. and Bartholomew, M. S. (1991). crystallization of catalytic subunit of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 200**: 508-521.
- Zheng, J., Trafny, E. A., Knighton, D. R., Xuong, N., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F. and Sowadski, J. M. (1993). "2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor." Acta Crystallographica Section D **49**(3): 362-365.
- Zheng, J. H., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Parello, J., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. (1992). "Crystallization studies of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: crystals of murine recombinant catalytic subunit and a mutant, Cys /Ser 343, diffract to 2.7 Å resolution." Acta Crystallographica Section B **48**(2): 241-244.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Kristallstrukturen mit kleinen Sondenmolekülen: Ausleuchten von Bindetaschen, Startpunkt für ein Fragment-basiertes Wirkstoffdesign und Erhalten von Phaseninformationen zur Strukturlösung“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

.....

(Jürgen Behnen)

Danksagung

Herrn *Prof. Dr. Gerhard Klebe* danke ich für die gute Betreuung und die interessante Themenstellung meiner Doktorarbeit. Ich danke ihm für das Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat und die Möglichkeit, die Themen eigenständig weiterentwickeln zu können. Viele Konzepte dieser Arbeit entstanden in persönlichen Gesprächen und Diskussionen, für die Sie sich immer Zeit genommen haben. Der Erfolg dieser Arbeit basiert auf der außerordentlich guten Ausstattung und der damit einhergehenden experimentellen Möglichkeiten. Zudem danke ich Ihnen, dass Sie mir die Möglichkeiten gegeben haben meine Ergebnisse auf internationalen Tagungen präsentieren zu können.

Herrn Dr. Andreas Heine danke ich für die gewissenhafte und fundierte Einführung in die Kristallographie. Ich danke Ihm, dass er mir bei jeglichen fachspezifischen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine Erfahrung hat maßgeblich zu der Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Reuter möchte ich für die Leitung des S1-Labores, der zur Verfügung stellen von ACL- und EctD-Kristallen sowie für seine freundliche Hilfe bei aufkommenden Fragestellungen.

Ich danke Prof. Joel L. Sussman und Prof. Israel Silman aus Rehovot, Israel, dass Sie mich in Ihre Arbeitsgruppe zu Forschungszwecken eingeladen und den Aufenthalt auch abseits der Arbeit so angenehm wie möglich gemacht haben. Weiter danke ich Ihnen für das zur Verfügung stellen von TcAChE und der daraus entstandenen Kooperation.

Ein außerordentlicher Dank gilt Herrn *Christian Sohn*, der durch seine fachmännische Betreuung den Röntgengenerator unserer Arbeitsgruppe immer einsatzbereit gehalten hat. Weiter war er immer hilfsbereit bei allen aufkommenden technischen und nicht technischen Problemen.

Bei Frau *Angela Scholz* und Frau *Lydia Hartleben* möchte ich mich für ihre unermüdliche und professionelle Unterstützung bei allen administrativen und organisatorischen Aspekten bedanken.

Herrn *Prof. Dr. Jochem Küppers* möchte ich besonders dafür danken, dass er durch sein Korrekturlesen die sprachliche Qualität dieser Arbeit erheblich verbessert hat.

Prof. Dr. Torsten Steinmetzer danke ich für die Zusammenarbeit bei der Organisation des Ersten Semesters. Allen Assistentenkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit als Erstsemesterteam.

Ein besonderer Dank gilt auch *Herrn Kan Fu* für die Zusammenarbeit im IspD-Projekt und seiner generellen Hilfsbereitschaft.

Ich danke allen Arbeitskollegen, die mir im Zuge dieser Arbeit immer wieder Proteinkristalle zur Verfügung gestellt haben; speziell, *Frau Dr. Tina Ritschel*, *Frau Helene Krüger* und *Herrn Florian Immekus*.

Herrn Hans-Dieter Gerber und *Herrn Dr. Sascha Brass* möchte ich danken für das zur Verfügung stellen von chemischen Substanzen, für ihre Hilfe und Anregungen bei vielen chemischen Fragestellungen.

Allen Administratoren dieser Arbeitsgruppe möchte ich für die Wartung der Rechner danken.

Mein Dank gilt allen Angestellten des BESSY II in Berlin und den Leuten, die vor Ort Datensätze aufgenommen haben.

Ich danke allen *Mietgliedern der Arbeitsgruppe Klebe* und *Diederich* für die Zusammenarbeit. Vor allem danke ich *Johannes*, *Florian*, *Sascha*, *Nan-Si*, *Tobias*, *Kan*, *Christian S.*, *Christian H.*, *Andreas S.*, *Michael*, *Nicola*, *Tina*, *Daniela* und *Frank* (AG Steinmetzer) für die schöne Zeit am Institut während meiner Promotion

Herrn *Johannes Schulze Wischeler* möchte ich danken für die ausgezeichnete Büroatmosphäre und seiner Freundschaft in den letzten Jahren.

Den ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe klebe *Dr. Jark Böttcher* und *Dr. Andreas Blum* danke ich für ihre anfängliche Unterstützung in jeglichen Fragen der Kristallographie, Linux und die Verwendung fachspezifischer Computerprogramme.

Herrn *Dr. Peter Haebel* möchte ich danken für die Einführung in die Proteinkristallographie, der Expression und Reining von Proteinen sowie der Weckung meines Forschergeistes.

Allen *Freunden in Marburg* möchte ich für eine schöne Zeit abseits der Pharmazie danken.

Meinen Freunden *Henning de Carne*, *Sven Heitland* und *Jan Berger* möchte ich dafür danken, dass sie dazu beigetragen haben, ein banales Grillen, seit Jahren, in einer Oase der Freundschaft und Quelle neuer Kraft zu verwandeln.

Ich danke meinen *Geschwistern Christa Weis* und *Klaus Behnen* für ihre große Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit.

Meiner Freundin *Frau Olga Müller* möchte ich besonders für ihre vielfältige, unermüdliche Unterstützung und Motivation während meiner Promotion und insbesondere in der Zeit der Erstellung dieses Dokumentes danken.

Meinen Eltern bin ich zu größtem Dank verpflichtet, da sie mir durch ihren Rückhalt, ihre allgegenwärtige und unermüdliche Unterstützung mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Lebenslauf Jürgen Behnen

Geburtsdatum	16. November 1979
Geburtsort	Meppen
Nationalität	Deutsch

SCHULBILDUNG

1999	Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,9)
1992 bis 1999	Gymnasium: Windthorst Gymnasium Meppen
1990 bis 1992	Orientierungsstufe: Geschwister Scholl Schule
1986 bis 1990	Grundschule: Ludgerischule

ZIVILDIENTST

08/1999 bis 06/2000	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz. Tätigkeitsbereich im Behindertenfahrdienst und mobilen Sozialen Hilfsdienst
---------------------	---

HOCHSCHULSTUDIUM

01/2007 bis heute	Promotion zum Thema: „Kristallstrukturen mit kleinen Sondenmolekülen: Ausleuchten von Bindetaschen, Startpunkt für ein Fragment-basiertes Wirkstoffdesign und Bestimmung von Phaseninformationen zur Strukturlösung“ im Arbeitskreis von Prof. Klebe an der Philipps Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie
03/2007	3.Staatsexamen mit Approbation als Apotheker (Note: 2,0)
05/2006 bis 11/2006	Tätigkeiten als Pharmaziepraktikant in der Sonnen-Apotheke, Marburg im Rahmen der einjährigen praktischen pharmazeutischen Ausbildung

Literatur

10/2005 bis 05/2006 Forschungsaufenthalt zum Thema: „Structural studies on proteins involved in the mycobactin biosynthese pathway“ der School of Biological Science im Arbeitskreis von Prof. E.N. Baker an der Auckland University, Neuseeland, im Rahmen der einjährigen praktischen pharmazeutischen Ausbildung

04/2001 bis 09/2005 Pharmaziestudium an der Philipps Universität Marburg

LEHRTÄTIGKEITEN

Seit 01/2007 Assistent im Praktikum „Qualitative Analyse anorganischer Stoffe“, 1. Semester Pharmazie

04/2007 bis 04/2010 Leitender Assistent des Praktikums